

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Moléculaire et
Cellulaire



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم : البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Science de
la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie

Thème

Composition phytochimique et activités antioxydante et
anti-inflammatoire *in vitro* des extraits phénoliques
de *Ceratonia seliqua*

Membres de Jury

Présidente : M^{me} REZZAGUI Abir
Examinatrice : Dr. RIANE Karima
Encadrante : Dr. BOUTENNOUN Hanane

Présenté par

M^{elle} : MIMOUN Merieme
M^{elle} : REZIG Sabrina
M^{elle} : BEKOUDJ Hassiba

Année Universitaire 2021-2022

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciements

Avant tout propos, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la santé, la capacité et la volonté jusqu'au bout pour mener à terme notre formation de master et pouvoir réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à notre encadrante Dr. Boutennoun Hanane, pour avoir encadré et dirigé ce travail ainsi que pour ses conseils, son aide précieux et la confiance qu'elle nous a témoigné tout au long de ce travail.

Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à M^{me} Rezzagui Abir, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Nous adressons un grand merci à Dr. Riane Karima pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant à examiner ce mémoire.

Nous ne serons achevés sans remercier nos chers parents qui nous ont soutenus durant tous ces années d'étude et qui nous ont encouragés sans cesse.

Enfin nous remercions tous ceux qui nous ont aidés, de près ou de loin, à l'achèvement de ce travail sans oublier l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.

Merci à Tous...

Dédicaces

A mes chers parents, pour leur amour, leur soutien et tous leurs sacrifices

A moi-même

*A mon seul frère **H**oussam et mes chères sœurs, **A**mina, **A**hlam, **S**zham et
son mari **N**assim*

*A ma petite nièce **F**atima et mon beau neveu **B**assem que dieu les garde et les
protège*

*A toute ma famille paternelle **M**imoun et ma famille maternelle **B**elatreh*

*A tous mes amies : **P**haima, **A**hlam, **R**oumaissa, **M**eroua, **N**aima et **N**ada*

*A mes collègues de travail **S**abrina et **H**assiba*

A tous ceux que j'aime, à tous ceux qui m'aiment, je dédie ce modeste travail.

Merieme

Dédicace

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes chers parents **Ammar** et **Houira** pour leur soutien et leur sacrifices qui m'ont dirigé et suivi pendant toute mes années d'étude.*

*A mes chères frères surtout **Nabil***

*A mes chères sœur **Massila**, **Fatima**, **Hazima** et son mari **Mohammed***

*A mes tantes **Rabia** et **Djarmila** et mes oncles.*

*A mes collègues **Marieme** et **Hassiba***

*À mes amies **Hadjer**, **Ratiba**, **Amel**, et **Nour el houda***

Je vous aime tous.

Sabrina

Dédicace

*Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du cœur à
ceux qu'on aime et qu'on remercie en exprimant la gratitude et la reconnaissance durant
toute notre existence.*

Je dédie ce modeste travail

*A mon cher père **Mohieddine**, que dieu lui fasse miséricorde. A ma mère
Rachida, sans elle, je n'aurais jamais abouti à ce stade d'étude, que Dieu puisse
m'aider à l'honorer, la servir et la combler*

*A mes chers frères : **Bzil, Tariq, Housseyn, Abderraouf,**
Fassine, et Boussay*

*A la famille **Bekoudj** en général*

*À mes chers amis et mes collègues de ce travail **Merieme** et **Sabrina**
et à ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

Hassiba

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 01

Partie bibliographique

Chapitre I : présentation de l'espèce étudiée *Ceratonia siliqua*

I.1. Description botanique 02

I.2. Répartition géographique 03

I.3. Noms vernaculaires 04

I.4. Classification systématique..... 04

I.5. Composition chimique 05

I.6. Utilisations thérapeutiques 05

Chapitre II : Stress oxydant

II.1. Définition de stress oxydant 07

II.2. Espèces réactives d'oxygène 07

II.2.1. Définition 07

II.2.2. Sources des ERO 08

II.3. Antioxydants et mécanismes d'action..... 08

II.3.1. Définition des antioxydants 08

II.3.2. Classification et mécanismes d'action des antioxydants 08

II.4. Stress oxydant et inflammation 11

Chapitre III : Inflammation

III.1. Définition et généralités 12

III.2. Mécanismes de l'inflammation 12

III.3. Anti-inflammatoires et leurs mécanismes d'action 13

III.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens..... 13

III.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens..... 14

III.3.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale..... 15

Partie pratique

I. Matériel et méthodes	16
I.1. Echantillonnage	16
I.2. Extraction des composés phénoliques	17
I.2.1. Macération	17
I.2.2. Filtration et décantation	17
I.2.3. Evaporation	18
I.2.4. Détermination du rendement d'extraction	18
I.3. Dosage phytochimique	18
I.3.1. Les composés phénoliques totaux	18
I.3.2. Les flavonoïdes	19
I.4. Etude de l'activité antioxydante	19
I.4.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH	19
I.4.2. Mesure du pouvoir réducteur de Fer	21
I.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> de <i>Ceratonia seliqua</i>	21
I.5.1. Inhibition de la dénaturation des protéines	21
I.5.2. Stabilisation de la membrane des globules rouges	22
I.6. Analyse statistique	23
II. Résultats et discussion	24
II.1. Rendements des extraits bruts	24
II.2. Etude phytochimique	25
I.2.1. Teneurs en polyphénols totaux	25
II.2.2. Teneurs en flavonoïdes	26
II.3. Résultats de l'activité antioxydante	27
II.3.1. Activité antiradicalaire (DPPH)	27
II.3.2. Pouvoir réducteur du Fer	30
II.4. Résultats de l'activité anti-inflammatoire	31
II.4.1. Inhibition de la dénaturation des protéines	31
II.4.2. Stabilisation de la membrane des globules rouges	33
Conclusion	35
Références bibliographiques	37

Annexes

Résumé

Liste des Abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AINS	: Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS	: Anti-inflammatoires stéroïdiens
AP-1	: Protéine activatrice-1
ATPase	: Adénosine triphosphatase
BSA	: Albumine de sérum bovine
Co Q10	: Coenzyme Q10
COX-2	: Cyclooxygénase-2
DAMP	: Damage-associated molecular patterns
DPPH	: 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl.
EAG	: Equivalent acide gallique
EB	: Extrait brute
EQ	: Equivalent de quercétine
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
GC	: Glucocorticoïdes
GPx	: Glutathione peroxidase
GR	: Récepteur des glucocorticoïdes
GRE	: Glucorticoid Response Element
GSH	: Glutathion réduit
IC₅₀	: Concentration inhibitrice médiane
iNOS	: Inductible Nitric Oxide Synthase
NADH	: Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen
NLRP3	: NOD-like receptor protein 3
NOD	: Nucleotide-binding oligomerization domain
PAMP	: Pathogen-associated molecular patterns
PRR	: Pattern recognition receptor
PS	: Poids sec
RNS	: Reactive Nitrogen Species
SOD	: Superoxyde dismutase
TCA	: Trichloracétique
TNF-α	: Tumor Necrosis Factor
α-TOH	: α - Tocophérol

Liste des figures

Figure 1 :	Arbre de caroubier (Jijel, 2022)	02
Figure 2 :	Feuilles du caroubier (Jijel, 2022).....	03
Figure 3 :	Gousses vertes et gousses mûres du caroubier (Jijel, 2022).....	03
Figure 4 :	Répartition mondiale du caroubier (zones colorées en noir).....	04
Figure 5 :	La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants.....	07
Figure 6 :	Interdépendance entre le stress oxydatif et l'inflammation.....	11
Figure 7 :	Mécanisme d'action des AINS.....	14
Figure 8 :	Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.....	15
Figure 9 :	Feuilles et fruits de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	16
Figure 10 :	La situation géographique de station de récolte (Google earth).....	16
Figure 11 :	Poudres des feuilles (A) et des fruits (B) de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	17
Figure 12 :	Evaporation des extraits bruts.....	18
Figure 13 :	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	20
Figure 14 :	Rendements des deux extraits méthanoliques de <i>Ceratonia siliqua</i> en pourcentage.....	24
Figure 15 :	Teneur en polyphénols des feuilles et fruit de <i>Ceratonia siliqua</i>	25
Figure 16 :	Teneur en flavonoïdes des feuilles et fruit de <i>Ceratonia siliqua</i>	26
Figure 17 :	Pouvoir réducteur DPPH des deux extrait et de standard exprimé en pourcentage.....	28
Figure 18 :	Pouvoir réducteur du Fer des deux extraits et du standard.....	30
Figure 19 :	Pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique des deux extraits comparé au standard.....	31
Figure 20 :	Pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges traités par l'extrait brut des feuilles et fruit de <i>Ceratonia siliqua</i> et diclofenac.....	33

Liste des tableaux

Tableau I :	Principaux espèces réactifs d'oxygène (radicalaire et non radicalaire).....	08
Tableau II :	Antioxydants enzymatiques et leurs mécanismes d'action.....	09
Tableau III :	Antioxydants non enzymatiques et leurs mécanismes d'action.....	10
Tableau IV :	IC ₅₀ du standard et des extraits des feuilles et fruit de <i>Ceratonia seliqua</i> de l'activité antiradicalaire DPPH.....	29
Tableau V :	IC ₅₀ du standard et des extraits des feuilles et fruit de <i>Ceratonia seliqua</i> de la dénaturation protéique	32
Tableau VI :	IC ₅₀ du standard et des extraits des feuilles et fruit de <i>Ceratonia seliqua</i> de stabilisation de la membrane des globules rouges.....	35

Introduction

La surproduction des espèces réactives d'oxygènes au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies y compris l'inflammation (Battu *et al.*, 2011). Cette dernière est une réaction de défense de l'organisme à la pénétration d'un agent infectieux, d'un antigène ou à des dommages cellulaires. Elle est un processus biologique fondamental et le signe le plus fréquent de maladie. Ainsi, l'inflammation et le stress oxydatif sont des événements physiopathologiques étroitement liés à un certain nombre de maladies chroniques, notamment le diabète, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le cancer et le vieillissement (Biswas, 2016).

La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèse de type anti-inflammatoire non stéroïdien ou stéroïdien (corticoïdes), dont les effets secondaires sont parfois graves et posent un problème majeur dans leur utilisation clinique. Par conséquent, pour surmonter leur toxicité, la mise au point de nouveaux anti-inflammatoires est toujours nécessaire et le produit naturel comme les plantes médicinales pourrait potentiellement servir de précurseur dans la production de nouveaux médicaments pour traiter l'inflammation avec des effets secondaires réduits ou nuls (Lachkar *et al.*, 2016).

Les plantes médicinales contiennent généralement des mélanges de différents composés chimiques (métabolites secondaires bioactifs tel que les polyphénols et les flavonoïdes) qui peuvent agir individuellement, de manière additive ou en synergie pour améliorer la santé (Gurib-Fakim, 2006).

Ceratonia siliqua est un arbre qui appartient à la famille des *Fabacées*, elle est typique de la région méditerranéenne. Elle se caractérise par son importance écologique et économique et également par ses propriétés médicinales et thérapeutiques (Ghanemi et Belarbi, 2021) y compris anti-inflammatoire, antimicrobienne, anti-diarrhéique, antioxydante, anti-ulcéreux, anti-constipation etc ... (Rtibi *et al.*, 2017).

Dans cette optique et dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales locales, *Ceratonia siliqua*, connue localement sous le nom de Kharroub a été choisie pour cette étude. Dans ce contexte l'objectif essentiel de la présente étude consiste à déterminer le contenu polyphénolique des extraits méthanoliques de deux parties de la plante (feuilles et fruit) et évaluer leur potentiel antioxydant et anti-inflammatoire *in vitro*.

Notre travail est structuré en deux parties : la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur le stress oxydatif, l'inflammation et la plante choisie. La deuxième partie est réservée à une étude expérimentale *in vitro* qui consiste à une analyse phytochimique et une évaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits de *Ceratonia siliqua*.

Partie
bibliographique

Chapitre I :
Présentation de
l'espèce étudiée
Ceratonia siliqua

I.1. Description botanique

Le caroubier (*Ceratonia siliqua*) appartenant à la famille des *Fabaceae* ; est une espèce arborescente à feuilles persistantes et thermophiles (Gugliuzzo et al., 2019). C'est un arbre typiquement méditerranéen qui croît sous les climats chauds (Benmahioul et al., 2011). Elle atteint des hauteurs de 10-15m (Figure1) et possède des couronnes larges et semi-sphériques, un tronc épais avec de nombreux lenticelles dont la base peut atteindre 2 à 3 mètres de circonférence (Öztürk, 2011), très crevassé, tortueux comme l'olivier, car le caroubier pousse aussi lentement et vit longtemps, jusqu'à 500 ans. Cette espèce ligneuse a une écorce lisse et grise à l'âge juvénile et brune, rugueuse à l'âge adulte. Les arbres possèdent une racine pivotante très profonde (16 m) et forte. Son bois est blanc-jaunâtre lorsqu'il est jeune et devient rose veiné puis rouge foncé et dur en vieillissant (Benmahioul et al., 2011).

Les feuilles de cette espèce sont organisées en 2-4 paires de feuilles sclérophylles coriaces composées-pennées mesurant 10-20 cm de long et 36,8 mm large. Elles sont vertes vives sur leurs faces supérieures et vertes ternes sur leurs faces inférieures et sont orbiculaires ou ovales (Figure 2). Les folioles pennées sont longues de 2 à 5 cm, larges de 1,5 à 4 cm, légèrement velues, ovales et ont des bords ondulés. L'arbre fleurit en automne (septembre-octobre) et la fertilisation se produit pendant cette période. Les fleurs sont petites et nombreuses, disposées en spirale le long de l'axe de l'inflorescence en racèmes (Öztürk, 2011). Le caroubier est une espèce dioïque et rarement monoïque et parfois hermaphrodite (Benmahioul et al., 2011).

Les caroubes sont les fruits de caroubier (Figure 3), ils sont de couleur brune foncée, allongés, compressés, droits ou courbés, et épaissis aux points de suture. Ils sont de 20-35 mm de largeur, et environ 150 mm de longueur, contenant 8-12 graines aplaties ovales et de couleur brune. La partie charnue entre les graines est remplie d'une substance sucrée. Le fruit pèse environ 20 g (Öztürk, 2011).



Figure 1 : Arbre de caroubier (Jijel, 2022)



Figure 2 : Feuilles du caroubier (Jijel, 2022)



Figure 3 : Gousses vertes et mûres du caroubier (Jijel, 2022)

I.2. Répartition géographique

L'origine du caroubier reste incertaine, avec existence de plusieurs hypothèses. Schweinfurth (1894) a insinué qu'il est originaire du Sud de l'Arabie (Yémen). Cependant, Zohary (1973) a considéré le caroubier comme originaire d'Indo Malaisie. D'autres auteurs, comme Vavilov (1951) et de Candolle (1983), ont rapporté qu'il serait natif de la région Est méditerranéenne (Turquie et Syrie) (Benmahioul et *al.*, 2011).

Aujourd'hui, en raison de la migration des cultures, le caroubier est répandu presque partout dans le monde, s'étend de la péninsule ibérique à la Turquie, y compris Espagne, Italie, Maroc, Grèce, Australie, Afrique du Sud, les États de Californie et d'Arizona aux États-Unis, l'Afrique du Nord et aussi certaines îles, telles que la Sicile, Malte et Chypre (Gugliuzzo, 2019; Krokou et *al.*, 2019) (Figure 4).



Figure 4 : Répartition mondiale du caroubier (zones colorées en noir) (Gugliuzzo et *al.*, 2019)

I.3. Noms vernaculaires

Le caroubier est aussi appelé carouge, pain de Saint Jean-Baptiste, figuier d'Egypte, fève de Pythagore (Benmahiouel et *al.*, 2011). En Algérie, il est connu comme « Kharroub », « Karrûba », «Taslighoua», «Tikharroubt» et «Tikida» (Boublenzaet *al.*, 2019).

I.4. Classification systématique

La classification de *Ceratonia siliqua* L. est la suivante (Fatima et *al.*, 2021)

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Fabales

Famille : *Fabacées* (Leguminosae)

Genre : *Ceratonia*

Espèce : *Ceratonia siliqua*.

I.5. Composition chimique

Les gousses de caroube contiennent de grandes quantités de glucides (40 à 60 %), de composés phénoliques, en particulier des tanins (18 à 20 %), des fibres alimentaires (27 à 50 %), des minéraux (potassium, sodium, fer, cuivre, manganèse et zinc) et de faibles quantités de protéines (3 à 4 %) et de lipides (0,4 à 0,8 %). Ce fruit est surtout connu pour sa richesse en sucres qui sont essentiellement composés de saccharose (32-38%), de fructose (5-7%) et de glucose (5-6%), mais leurs proportions relatives sont variables. Pour les polyphénols des gousses de caroubes, de nombreuses données obtenues par les méthodes de chromatographie effectuées par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ont révélé la présence de tanins condensés (proanthocyanidines), composés de flavanes-3-ol et leurs esters galloyl, acide gallique, catéchine, épicatechingal tardif, gallocatéchingallate et également la présence de tanins hydrolysables (gallotannins et ellagitannins) (Rtibi et al., 2017).

La composition chimique de la pulpe de caroube varie selon les facteurs génétiques, environnementaux, climatiques et la saison de récolte ainsi que le type de plante (mâle, femelle ou hermaphrodite) (Brassesco et al., 2021). Elle varie aussi selon les espèces de caroubes, le stade de maturité et les différentes parties de l'arbre. En effet, l'analyse HPLC a montré que les principaux composés sont : le pyrogallol, la catéchine et l'acide tannique dans les caroubes matures. Toutefois, cette technique a révélé le pyrogallol, la catéchine, l'acide gallique, l'acide chlorogénique et l'épicatechin dans les caroubes immatures (Owen, 2003 ; Rtibi et al., 2016 ; Rtibi et al., 2017).

Dans les feuilles, plusieurs composés ont été trouvés tels que les polyphénols (sous forme de kaempferol, d'acide tannique, de catéchine hydratée et de polydatine) et les flavonoïdes, en plus de divers minéraux tels que le calcium, le fer et le potassium. De même, il a été constaté que les feuilles de caroubier sont plus riches en fibres que les gousses de caroubier (Rtibi et al., 2017 ; Lakkab et al., 2018).

I.6. Utilisations thérapeutiques

Ceratonia siliqua est bien connue pour ses propriétés médicinales. Les caroubes exercent des activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antidiarrhéiques, antioxydantes, anti-ulcères, anti-constipation et anti-absorbants du glucose dans le tractus gastro-intestinal (Makris et Kefalas, 2004 ; Rtibi et al., 2015, Rtibi et al., 2017). Les feuilles et les écorces de caroube présentent également un potentiel exceptionnel d'utilisation comme agents antidiabétiques (Custódio et al., 2015). En outre, la partie écorce s'est révélée exercer un effet anti-inflammatoire et antioxydant (Lachkar et al., 2016), tandis que les feuilles ont inhibé la prolifération des cellules tumorales (Corsi et al., 2002). La caroube contient également des fibres alimentaires qui peuvent être utilisées

dans l'industrie pharmaceutique, car elles ont de nombreux effets positifs sur la glycémie, le taux de cholestérol et le cancer. De plus, la caroube contient des tanins, qui sont généralement utilisés dans le traitement des troubles liés à la diarrhée chronique (Boublenza et *al.*, 2019). Il contribue également à réduire le taux de cholestérol, problèmes d'obésité, troubles diarrhéiques infantiles et dysenterie bactérienne (Gugliuzzo, 2019). La pulpe est préconisée contre la tuberculose pulmonaire (Benmahioul et *al.*, 2011).

Les feuilles de caroube ont également été traditionnellement étudiées en médecine populaire pour le traitement de diverses maladies en raison de leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antitumorales et antiprolifératives. Ces effets importants sont dus à l'abondance de métabolites secondaires qui agissent comme molécules bioactives. Les composés phénoliques et les flavonoïdes sont présents en quantités importantes et sont considérés comme bénéfiques contre le stress oxydatif (Othmen et *al.*, 2020).

La gomme de caroube peut être utilisée dans le traitement ou le contrôle de l'hyperlipidémie (taux de cholestérol élevé dans le plasma). Une autre valeur médicinale de la gomme de caroube est sa capacité à réduire les conditions gastro-intestinales, en particulier la diarrhée chez les nourrissons. L'utilisation de la gomme de caroube comme solution de réhydratation orale a donné des résultats prometteurs pour le traitement de la diarrhée infantile. La gomme de caroube peut agir comme un épaississant pour absorber l'eau et aider à lier les selles aqueuses (Dakia, 2011).

Chapitre II :
Stress oxydant

II.1. Définition du stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme étant un déséquilibre entre la production des ERO (espèces réactives d'oxygène) et les capacités de défense antioxydante de l'organisme (Baudin, 2020) (Figure 5). Cette situation peut être due à une diminution des défenses antioxydantes ou à une augmentation de production des ERO (Orban, 2011). Quand l'un ou l'autre de ces mécanismes est présent, le stress oxydant est initié et contribue par ses conséquences multiples touchant les acides nucléiques, les protéines ou les lipides à la pathogénie de certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives ou le cancer (Morena *et al.*, 2002).

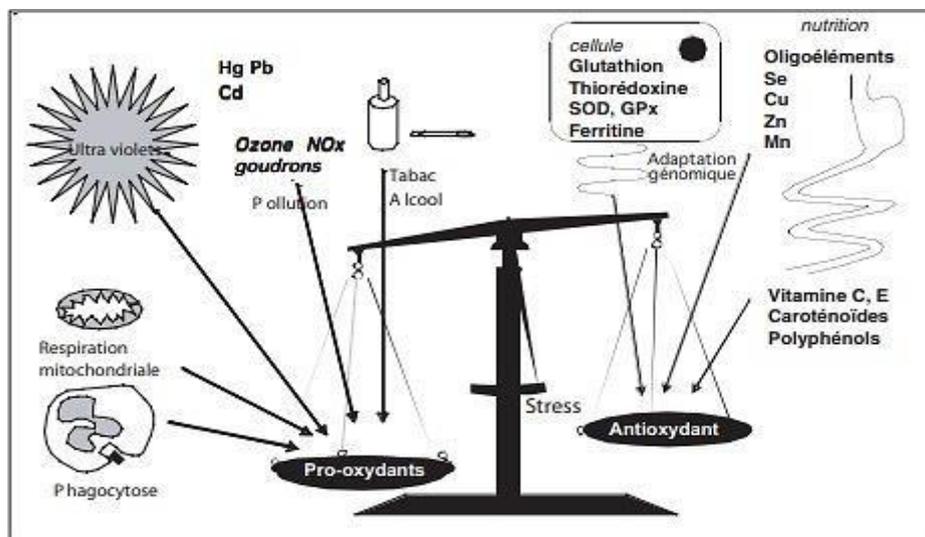


Figure 5 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

Cd : Cadmium ; **Cu** : Cuivre ; **GPx** : Glutathion peroxydase ; **Hg** : Mercure ; **Mn** : Manganèse ; **NOx** : Oxyde d'azote ; **Pb** : Plomb ; **Se** : Sélénium ; **SOD** : Seperoxyde dismutase ; **Zn** : Zinc.

II.2. Espèces réactives d'oxygène

II.2.1. Définition

Les ERO englobent un groupe de molécules dérivées de l'oxygène moléculaire, qui sont formées par des réactions de réduction-oxydation (redox) ou par excitation électronique, ils peuvent être divisés en radicaux libres et non radicaux (Tableau I) (Sies et Jones, 2020). Elles sont des sous-produits de nombreuses voies métaboliques, mais les mitochondries sont le principal site cellulaire où l' O_2 est réduit (Hernández-García *et al.*, 2010).

Tableau I : Principaux espèces réactives d'oxygène (radicalaires et non radicalaires) (Sies et *al.*, 2017)

Espèce radicalaires	Espèce non radicalaires
Anion super oxyde ($O_2^{\cdot-}$)	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
Radical hydroxyle (OH^{\cdot})	Ozone (O_3)
Radical alcoxyle (RO^{\cdot})	Oxygène singulet (1O_2)
Radical peroxyde (ROO^{\cdot})	Radical hydroperoxyde ($ROOH^{\cdot}$)

II.2.2. Sources des ERO

Les radicaux libres sont générés à partir de sources endogènes et exogènes (Pizzino et *al.*, 2017). Les bases intrinsèques de la production des ERO comprennent généralement des mitochondries, des cellules inflammatoires et certains complexes enzymatiques qui ont une forte consommation d'oxygène (Golbashirzadeh et *al.*, 2022). Les sources extracellulaires de radicaux libres sont les rayonnements ionisants, la cigarette, certains polluants, pesticides et certains médicaments qui peuvent pénétrer dans le corps et se décomposer en espèces réactives et entraîner des dommages oxydatifs subséquents aux tissus cibles. De plus, les métaux comme le fer, le cuivre, le chrome, le plomb, le mercure, le nickel et le vanadium peuvent produire des ERO (Aslani et Ghobadi, 2016).

II.3. Antioxydants et mécanismes d'action

II.3.1. Définition des antioxydants

Le concept d'antioxydant biologique désigne tout composé qui lorsqu'il est présent à une concentration inférieure à celle d'un substrat oxydable, est capable de retarder ou d'empêcher l'oxydation de ce substrat (Pisoschi et Pop, 2015). Les antioxydants peuvent être divisés en deux catégories : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques (Aslani et Ghobadi, 2016).

II.3.2. Classification et mécanisme d'action des antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydants (Haleng et *al.*, 2007). Les antioxydants peuvent également être différenciés selon leur mécanisme d'intervention. Une première ligne de défense est assurée par les antioxydants dits « préventifs » et une deuxième ligne est assurée par des antioxydants peuvent également intervenir en tant que « scavenger » ; piègeurs des ERO (Durand et *al.*, 2013).

➤ **Antioxydants préventifs**

Il s'agit d'un ensemble d'antioxydants qui agissent pour supprimer ou empêcher la formation de radicaux libres ou d'espèces réactives dans les cellules. Trois enzymes clés super oxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase sont en tête de liste. Ces enzymes dismutent respectivement le radical superoxyde, décomposent les peroxydes d'hydrogène et les hydroperoxydes en molécules inoffensives (H_2O_2 /alcool et O_2). (Ighodaro,et Akinloye, 2018) (Tableau II).

Tableau II : Antioxydants enzymatiques et leurs mécanismes d'action

Enzyme	Mécanisme d'action
Super oxyde dismutase SOD	SOD est un metalloenzyme qui catalyse la dégradation du superoxyde en Oxygène et en peroxyde d'hydrogène (Demirci-Çekiç et <i>al.</i> , 2022).
Catalase	Catalyse la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène à des produits non toxiques (eau et oxygène) (Demirci-Çekiç et <i>al.</i> , 2022).
Glutathion peroxydase	GPx catalyse la réduction de H_2O_2 ou de peroxyde organique (ROOH) en eau ou en alcool (Aslani et Ghobadi, 2016).

➤ **Antioxydants piègeurs ou capteurs des ERO**

Ce groupe d'antioxydants est souvent appelé antioxydants de piégeage. Ils neutralisent ou récupèrent les radicaux libres en leur donnant des électrons et ce faisant deviennent eux-mêmes des radicaux libres, mais avec des effets moins nocifs (Ighodaro et Akinloye, 2018). Ce groupe y compris des antioxydants non-enzymatiques endogènes tels que le glutathion, l'acide urique, coenzyme Q10...etc et exogènes comme l'acide ascorbique (vitamine C), tocophérol (vitamine E), les polyphénols...etc (Aslani et Ghobadi, 2016) (Tableau III).

Tableau III : Antioxydants non enzymatiques et leurs mécanismes d'action

Antioxydants non enzymatiques		Mécanismes d'action
Endogènes	Glutathion	Le GSH est un cofacteur de plusieurs enzymes détoxifiantes, comme le GSH-Px et la transférase. Il a plusieurs effets antioxydants. Il détoxifie le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques par l'action du GSH-Px. Le GSH donne son électron à H ₂ O ₂ pour le réduire en H ₂ O et O ₂ (Birben et <i>al.</i> , 2012).
	Acide urique	L'acide urique est un piègeur efficace de l'oxygène singulet, des radicaux peroxy et hydroxyle et protège la membrane érythrocytaire de la peroxydation lipidique (Pisoschi et Pop, 2015).
	Coenzyme Q10	Co Q10 est un antioxydant avec une action directe sur les radicaux Peroxyliques ou avec une action indirecte par la régénération des vitamines C et E (Finaud et <i>al.</i> , 2006).
Exogènes	Vitamine C	La vitamine C est un excellent piègeur des ERO (HO [•] ou O ₂ ^{•-}). Elle Inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques (Haleng et <i>al.</i> , 2007).
	Vitamine E	La vitamine E capte l'électron célibataire trouvé dans les ERO, RO (alcoolate) et ROO (alcoxy), et les stabilise par résonance, interrompant ainsi la chaîne de propagation radicalaire dans les membranes cellulaires. Elle les protège de la peroxydation lipidique et de ses effets délétères sur les membranes selon le mécanisme suivant : Vitamine E $\alpha\text{-TOH} + \text{ROO} \rightarrow \alpha\text{-TO} + \text{ROOH}$ (Baudin, 2020).
	Polyphénols	L'existence de groupes hydroxyles dans les composés phénoliques leur permet de piéger divers radicaux libres. De plus, la capacité des composés phénoliques à chélater les métaux et à inhiber la lipoxygénase affecte également l'oxydation des lipides (Liu et <i>al.</i> , 2022).

II.4. Stress oxydant et inflammation

Le stress oxydatif et l'inflammation sont des processus interdépendants et interconnectés qui coexistent dans le milieu enflammé. Les cellules inflammatoires libèrent un certain nombre des ERO sur le site de l'inflammation, entraînant des dommages oxydatifs exagérés. De plus, un certain nombre des ERO et de produits de stress oxydatif améliorent les réponses pro-inflammatoires (McGarry et *al.*, 2018).

Le stress oxydatif peut également induire une inflammation par l'activation de multiples voies. L'espèce réactive peroxyde d'hydrogène peut induire une inflammation par activation du facteur de transcription NF- κ B (Biswas et *al.*, 2016) qui régule la production de cytokines inflammatoires, comme l'interleukine-1 β (IL-1 β) ou le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et d'autres médiateurs, comme l'iNOS ou la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Sánchez et *al.*, 2015). De plus, le stress oxydatif joue un rôle important dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor protein 3) (Zhou et *al.*, 2011).

L'inflammation et le stress oxydatif sont des processus physiopathologiques étroitement liés (Figure 6). L'un d'eux peut apparaître avant ou après l'autre, mais quand l'un d'eux apparaît l'autre est le plus susceptible d'apparaître et puis les deux prennent part à la pathogenèse de nombreuses maladies chroniques (Biswas et *al.*, 2016).

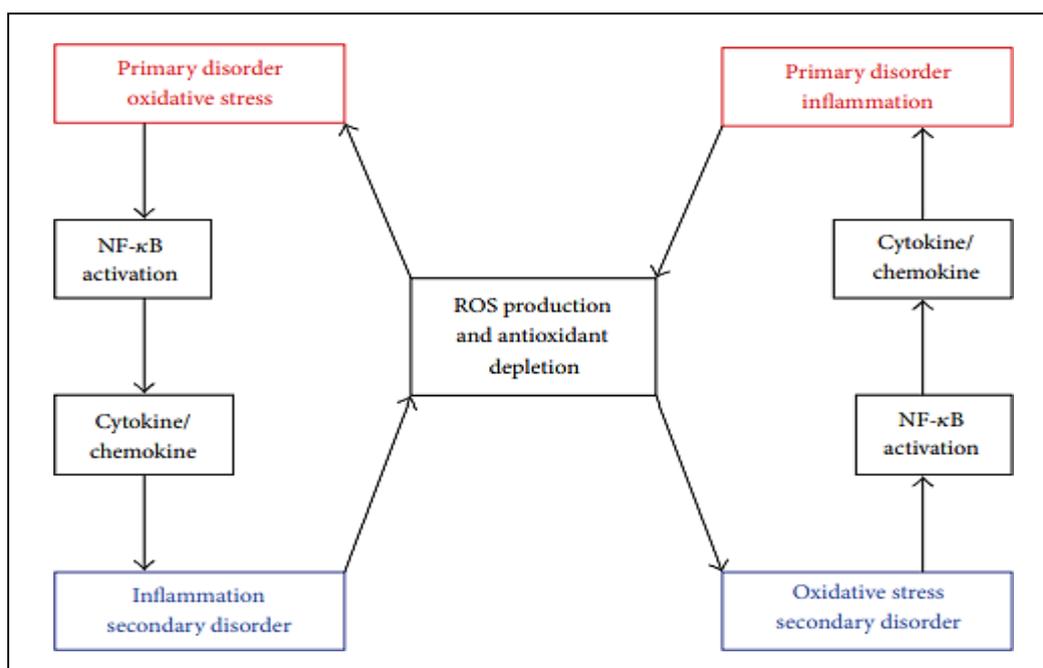


Figure 6 : Interdépendance entre le stress oxydatif et l'inflammation (Biswas et *al.*, 2016).

NF- κ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B Cells ; **ROS :** Reactive oxygen species.

Chapitre III : ***Inflammation***

III.1. Définition et généralités

L'inflammation est une réponse biologique complexe des tissus vasculaires qui est déclenchée par les facteurs physiques comme le froid, la chaleur, les rayonnements ionisants..., chimiques tel que les toxines, médicaments...et par des corps étrangers exogènes ou endogènes. Elle se caractérise par quatre signes cliniques cardinaux, à savoir la rougeur, le gonflement, la douleur et la chaleur (Weil et Batteux, 2003 ; Lachkar *et al.*, 2016). C'est la première ligne de défense de l'organisme donc c'est une réponse immune non spécifique (Canaud *et al.*, 2003).

Elle se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé ; les tissus dépourvus de vaisseaux (cornée, cartilage) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. Son but est d'éliminer ou d'isoler l'agent pathogène (Medzhitov, 2008). La réponse inflammatoire peut être divisée en deux formes d'attaque pour éliminer le tissu endommagé et rectifier le déséquilibre homéostatique : réactions aiguës et chroniques (Greig *et al.*, 2012). C'est un processus médié par des cellules dites inflammatoires telles que les macrophages et les neutrophiles mais aussi par les cellules endothéliales (Noack et Kolopp-Sarda, 2018).

III.2. Mécanisme d'inflammation

La première étape de la cascade inflammatoire implique la reconnaissance d'une infection ou d'une lésion. Ceci est généralement réalisé par la détection des PAMP (pathogen-associated molecular patterns) qui sont dérivés de micro-organismes, et DAMP (damage-associated molecular patterns) qui sont des molécules endogènes qui signalent des dommages ou une nécrose (Ashley *et al.*, 2012; Hirayama *et al.*, 2017). Ces deux motifs sont reconnus par les récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) intracellulaires ou exprimés en surface, qui se trouvent au niveau des cellules immunitaires innées telles que les macrophages, les fibroblastes, les mastocytes et les cellules dendritiques ainsi que sur de nombreuses cellules épithéliales (Newton et Dixit, 2012).

Une fois la reconnaissance effectuée, les PRR activent des voies de signalisation communes qui aboutissent à l'activation de NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B Cells) (Ashley *et al.*, 2012), qui est responsable de l'induction de transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines et les médiateurs inflammatoires supplémentaires dans différents types de cellules immunitaires innées (Liu *et al.*, 2017). Un sous-ensemble de PRR active la protéase caspase-1, qui convertit les cytokines IL-1 et IL-18 en des formes actives qui provoquent ensuite une inflammation après avoir été libérée de la cellule (Newton et Dixit, 2012). Les neutrophiles et les monocytes transmis par le sang migrent vers le site de la perturbation par chimiotaxie et traversent sélectivement les cellules endothéliales. Cet afflux de cellules s'accompagne d'un liquide riche en protéines, appelé exsudat, et favorise l'œdème (gonflement). Les mastocytes

et les macrophages résidant dans les tissus favorisent cette migration en libérant de l'histamine, des leucotriènes et des prostaglandines, qui ont des effets rapides sur le système vasculaire, notamment une vasodilatation et une perméabilité vasculaire accrue. Les neutrophiles libèrent des composés toxiques, notamment des ERO, des RNS (reactive nitrogen species) et diverses protéases, qui éliminent l'agent pathogène (Ashley *et al.*, 2012 ; Noack *et al.*, 2018).

III.3. Anti-inflammatoires et leurs mécanismes d'action

Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui peuvent réduire l'inflammation, la douleur et dans certaines cas la fièvre (Chebira et Boudjaadar, 2014). L'emploi des agents anti-inflammatoires peut être utile dans le traitement thérapeutique des pathologies associées avec la réaction inflammatoire (Lachkar *et al.*, 2016). Ils sont classés en anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) (cortisone et ses dérivés), anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et anti-inflammatoires naturels.

III.3.1 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Ils sont largement utilisés en cause de leur efficacité dans la prise en charge de la douleur, de la fièvre, de l'inflammation et des troubles rhumatismaux (Ouedraogo *et al.*, 2012).

Leur mode d'action (Figure 7) repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase COX 1 et/ou 2, une enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines importants médiateurs de l'inflammation (Blain *et al.*, 2000). Les AINS classiques, c'est-à-dire non sélectifs, inhibent les deux isoformes de la COX (COX-1 et COX-2), contrairement aux AINS sélectifs de la COX-2 (coxib) (Orliaguet *et al.*, 2013). Les isoenzymes COX convertissent d'abord l'acide arachidonique en prostaglandine PGG₂, puis en PGH₂, qui subit une série de réactions de conversion ultérieures, produisant finalement cinq prostanoides bioactifs, à savoir PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , PGI₂ (prostacycline) et thromboxane A₂ (TxA₂) (Brune et Patrignani, 2015).

Malheureusement, les AINS sont également associés à de nombreux effets délétères car leur utilisation prolongée provoque des troubles gastro-intestinaux et cardiovasculaires (Antman *et al.*, 2007). D'autres effets secondaires comme l'hypertension associée au dysfonctionnement rénal ont été également mentionnés (Orliaguet *et al.*, 2013).

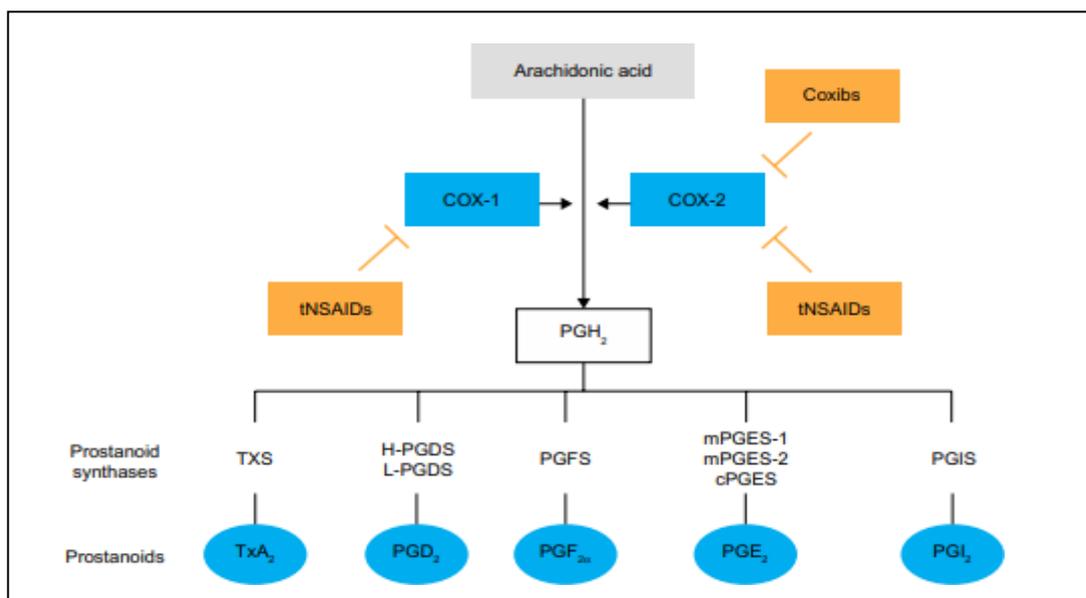


Figure 7 : Mécanisme d'action des AINS (Brune et Patrignani, 2015).

Cox-1 et 2 : Cyclooxygénase-1 et 2 ; **Coxibs** : AINS sélectifs de la COX-2 ; **cPGES** : Cytosolic prostaglandin E synthase ; **H-PGDS** : Hematopoietic prostaglandin D synthase ; **L-PGDS** : Lipocalin prostaglandin D synthase ; **mPGES-1 et 2** : Microsomal prostaglandin E synthase-1 et 2 ; **PGD₂, PGF_{2α}, PGE₂ et PGI₂** : Prostaglandin D,F,E et I ; **PGFS** : Prostaglandin F synthase ; **PGH₂** : Prostaglandines H₂ ; **PGIS** : Prostaglandin I synthase ; **tNSAIDs** : Traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs ; **TxA₂** : Thromboxane A₂ ; **TXS** : Thromboxane synthase,

III.3.2 Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes (GC)

Ils constituent une classe des médicaments qui sont des dérivés synthétiques de la cortisol tel que les glucocorticoïdes (Adcock, 2000) (Figure 8); ils sont la thérapie la plus efficace pour le traitement des maladies inflammatoires telles que l'asthme.

Les glucocorticoïdes sont des hormones lipophiles et peuvent donc traverser la membrane plasmique. Leur mode d'action se situe essentiellement au niveau transcriptionnel (Löwenberg *et al.*, 2007), où ils sont capables de se fixer sur des récepteurs spécifiques GR (récepteur des glucocorticoïdes) localisé dans le cytoplasme des cellules cibles qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes. Après, ils migrent vers le noyau et agissent directement sur l'ADN en se fixant sur des séquences spécifiques, dites GRE (Glucocorticoid Response Element) et forment un complexe récepteur-ligand. Ces séquences sont présentes sur le promoteur des gènes de nombreux médiateurs de la réponse inflammatoire (Roquilly et Asehnoune, 2019). Les GC ainsi peuvent augmenter la transcription des gènes anti-inflammatoires et inhiber l'action de certaines protéines nucléaires transactivatrices, dont le NF-κB et la protéine activatrice-1 (AP-1), inhibant ainsi l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (tel que IL-1, IL-6, IL-2 et TNF-α) ; récepteurs et molécules d'adhésion et la production de la phospholipase A2 (Rhen et Cidlowski, 2005).

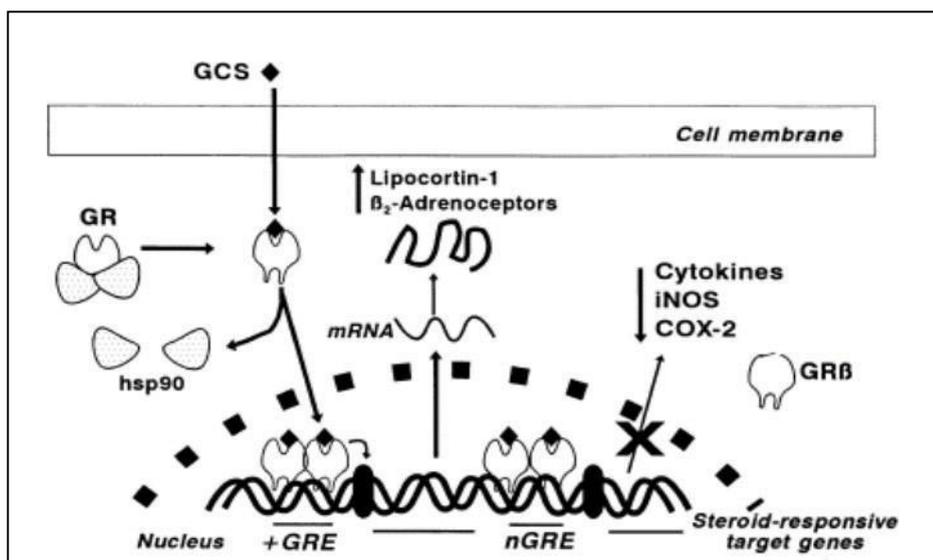


Figure 8 : Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (Barnes, 1998).

COX-2 : Cyclooxygénase-2 ; **GCS** : Glucocorticoïdes ; **GR** : Glucocorticoïde récepteur ; **GRE** : Glucocorticoïde Response Element ; **GRβ** : Glucocorticoïde récepteur ; **hsp 90** : heat shock protein 90 ; **iNOS** : Inductible Nitric Oxide Synthase ; **mRNA** : Messenger ribonucleic acid.

III.3.3. Anti-inflammatoires d'origines végétales

Les plantes médicinales sont très utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde pour le soulagement des maladies inflammatoires tel que l'arthrite rhumatoïde, la bronchite, l'eczéma, les ulcères gastriques, la goutte... (Setty et Sigal, 2005 ; Wiart., 2006). Les substances d'origine végétale, appartenant aux classes chimiques les plus diverses, ont déjà démontré une activité anti-inflammatoire prouvée (Fialho et *al.*, 2018). Par mieux, les alcaloïdes, les terpènes et les composés phénoliques tels que les tanins, les lignanes, les coumarines, les saponines et surtout les flavonoïdes (Nunes et *al.*, 2020).

Certains composés phénoliques interagissent avec les protéines impliquées dans la transduction du signal et l'expression des gènes, réduisant la production de médiateurs pro-inflammatoires par l'inhibition du système complexe NF-κB/IκB (Recio et *al.*, 2012).

Les flavonoïdes ont une capacité anti-inflammatoire puisqu'ils inhibent la production de médiateurs inflammatoires en modulant la voie de l'acide arachidonique, en inhibant plusieurs enzymes telles que l'ATPase, la prostaglandine, la cyclooxygénase, la lipoxygénase, la NADH oxydase, la protéine kinase, les hydrolases, les peroxydases, les métallopeptidases, les tyrosinases et les phospholipases. Ainsi, les flavonoïdes ont été la cible d'un intérêt croissant en tant que médicament thérapeutique potentiel pour inhiber ou même diminuer l'activité inflammatoire (Rex et *al.*, 2018 ; Nunes et *al.*, 2020).

Partie pratique

I. Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Echantillonnage

➤ Récolte

La présente étude est portée sur l'espèce *Ceratonia siliqua* de la famille des *Fabaceae* au niveau de Laboratoire de Biochimie, Faculté de Science de la Nature et de la Vie, Université de Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel. Les parties aériennes de la plante (feuilles et fruits) (Figure 9) ont été collectées en mois de Mars au niveau de la Wilaya de Jijel dans la région d'Ouled Yahia, Milia (Figure 10).



Figure 9 : Feuilles et fruits de *Ceratonia siliqua*



Figure 10 : La situation géographique de station de récolte (Google earth).

➤ Séchage et broyage

Après lavage, les feuilles et les fruits ont été séchés quelques jours dans une étuve de type Memmert, à une température de 40°C dans le but d'enlever l'eau qu'elles renferment et d'empêcher la contamination par les insectes ou le développement des champignons à cause du taux d'humidité élevé. Ensuite les échantillons séchés ont été finement broyés à l'aide d'un broyeur électrique de type (GRINDOMIX). Après broyage, les poudres obtenues ont été tamisées à l'aide d'un tamis de

(type CISA) dont le diamètre des pores est de 250 μm (Figure 11). Afin d'empêcher la photo-oxydation, les poudres ont été conservées à l'obscurité dans des flacons en verre hermétiques.

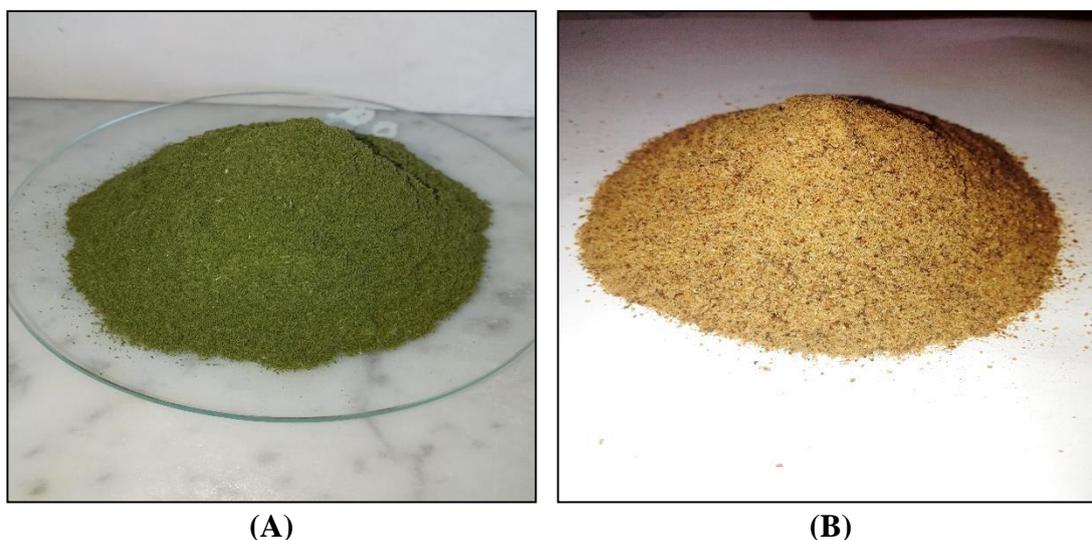


Figure 11 : Poudres des feuilles (A) et des fruits (B) de *Ceratonia siliqua*.

I.2. Extraction des composés phénoliques

Les procédés d'extraction des composés phytochimiques à partir du matériel végétal représentent une étape préalable à toute analyse phytochimique. Dans le cadre de ce travail l'extraction des composés phénoliques a été effectuée selon la méthode de Tadeq et ses collaborateurs (2005) avec quelques modifications.

I.2.1. Macération

La poudre de chacun des deux échantillons est mise à macération dans d'un mélange méthanol/eau (80/20 : V/V) à un rapport de 10 g/100ml sous agitation magnétique à l'aide d'un agitateur magnétique de type IKA RH basic 2 pendant 48 h à une température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydations. L'agitation permet le maintien des particules en suspension et l'homogénéité des milieux.

I.2.2. Filtration et décantation

Après macération, les deux solutions des deux échantillons ont été filtrées à l'aide de papier Whatman N°3. Chaque filtrat obtenu a été ajusté avec 200ml d'hexane. Les mélanges ont été par la suite décantés pour recueillir les phases méthanoliques.

I.2.3. Evaporation

Les phases méthanoliques des échantillons ont été évaporées à l'aide d'un rotavapeur de type Heidolph (Figure 12) puis, ont été séchées à l'étuve à 40°C jusqu'à ce que le solvant soit totalement évaporé. Les extraits secs ainsi constitués sont conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation pour les différents tests.



Figure 12 : Evaporation des extraits bruts.

I.2.4. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement des extraits bruts est le rapport entre le poids de l'extrait sec et le poids de la plante en poudre utilisée. Il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = P_s / P_p \times 100$$

Où :

P_s: Poids de l'extrait sec en gramme (g).

P_p : Poids de la poudre en gramme (g).

I.3. Dosage phytochimique

I.3.1. Les composés phénoliques totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les deux extraits de la plante a été réalisé selon la méthode de Folin Ciocalteu (Heilerova et *al.*, 2003). C'est une méthode colorimétrique qui permet l'analyse des composés organiques qui ont des cycles aromatiques hydroxylés. La méthode est sensible et permet de mesurer la teneur en composés phénoliques. Ces derniers réagissent au réactif de Folin Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) et

d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$), entraînant une coloration bleue qui peut être déterminée par spectrophotométrie à 750 nm (Vázquez et al., 2015).

Brièvement, 0,2 ml des deux extraits bruts dilués (250 µg/ml) ont été additionnés avec 1,5 ml du réactif de Folin Ciocalteu (1/10). Le mélange est laissé reposer 5 minutes à l'obscurité. Par la suite, 1,5 ml de la solution Na_2CO_3 (7,5%) a été ajouté à l'ensemble. Après 90 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 750 nm contre un blanc sans extrait par l'utilisation d'un spectrophotomètre de type (Spectro® 50 plus).

La quantification des polyphénols a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($Y = aX + b$) réalisée par un extrait étalon, l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon (Annexe 1). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait brute (mg EAG/g EB).

I.3.2. Les flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes est couramment basée sur l'utilisation du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (Huang et al., 2004). Le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) forme un complexe jaune stable avec les groupements hydroxyles (OH) des phénols. Ceci se traduit par le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Dewanto et al., 2002).

Pour réaliser le dosage, 1,5ml de chaque extrait (2 mg/ml) ont été ajoutés à 1,5 ml d'une solution d' $AlCl_3$ (2%). Les différentes solutions ont été incubées à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min et l'absorbance a été lue à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage ($Y = aX + b$) réalisée par la quercétine à différentes concentrations pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons ont servis pour la quantification des flavonoïdes (Annexe 2). La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait brute (mg EQ/g EB).

I.4. Etude de l'activité antioxydante

I.4.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

➤ Principe

Le DPPH est un radical stable en solution et apparaît de couleur violette absorbant à 515 nm dans le méthanol. Ce dosage est basé sur le principe que $DPPH\cdot$ lors de l'acceptation d'un atome d'hydrogène (H) de la molécule piègeuse, c'est-à-dire un antioxydant, entraînant une réduction de $DPPH\cdot$ en $DPPH_2$ (figure 13), la couleur violette passe au jaune avec une diminution concomitante de l'absorbance à 515 nm. Le changement de couleur est contrôlé par spectrophotométrie et utilisé pour la détermination des paramètres des propriétés antioxydants (Mishra et al., 2012).

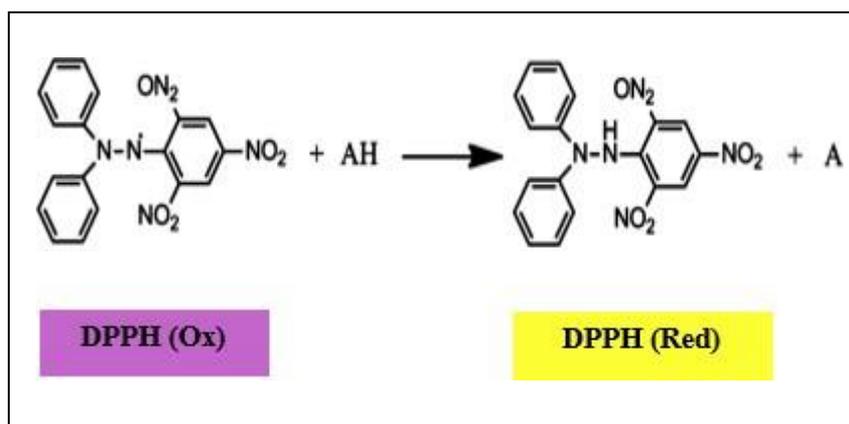


Figure 13 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Sirivibulkovit et *al.*, 2018)

➤ **Mode opératoire**

Pour réaliser l'analyse, 2,9 ml de la solution méthanolique de DPPH (0,025 g/l) ont été ajoutés à 100 µl de la solution de chaque extrait ou standard (acide ascorbique) à différentes concentrations (25-200 µg/ml). Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 515 nm.

L'activité antiradicalaire des extraits a été exprimée en pourcentage d'inhibition du DPPH° et calculée par la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = (\text{A}_T - \text{A}_E / \text{A}_T) \times 100$$

Où :

A_T : Absorbance du témoin après 30 min d'incubation.

A_E : Absorbance de l'échantillon après 30 min d'incubation.

➤ **Détermination de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀)**

L'IC₅₀ est définie comme la concentration en antioxydant nécessaire pour obtenir une inhibition radicalaire de 50 %. Une faible valeur de l'IC₅₀ indique une forte activité antioxydant (Molyneux, 2004 ; Chen et *al.*, 2013). Pour chaque extrait ou antioxydant de référence, une courbe de régression linéaire ($Y = aX + b$) est établie afin de calculer l'IC₅₀ qui permettra la caractérisation du pouvoir antioxydant des extraits.

I.4.2. Mesure du pouvoir réducteur de Fer

➤ Principe

Le pouvoir réducteur est défini comme étant la capacité d'un antioxydant à transférer un électron ou à libérer un atome d'hydrogène (Tuksitha et al., 2018). Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) (Bentabet et al., 2014). La forme réduite donne une couleur bleu-verte, l'absorbance a été mesurée à 700 nm ; une absorption accrue indique un pouvoir réducteur élevé (Balasundram et al., 2005).

➤ Mode opératoire

La détermination du pouvoir réducteur a été réalisée selon la méthode d'Oyaizu (1986) décrite par Hseu et ses collaborateurs (2008) avec une légère modification. 1ml de chaque extrait, à différentes concentrations (25 - 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a été ajouté à 2 ml de tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6) et à 1ml de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] à 1 %. Les mélanges ont été incubés à 50°C dans un bain marie pendant 20 min à l'abri de la lumière. Après incubation 1 ml de trichloracétique (TCA) à 10 % a été additionné à chaque mélange et les tubes ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Par la suite 1,5 ml de surnageant ont été récupérés et ajoutés à 1,5 ml d'eau distillée et 150 μl de chlorure ferrique (0,1 %). Les mélanges homogénéisés préalablement, ont été incubés pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est lue à 700 nm.

L'acide ascorbique est utilisé comme standard, dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

I.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de *Ceratonia seliqua*

I.5.1. Inhibition de la dénaturation des protéines

➤ Principe

La dénaturation affecte presque toutes les propriétés physico-chimiques des molécules ; elle varie considérablement avec les divers agents physiques et chimiques qui l'entraînent et aussi selon le caractère et la concentration des solutions protéiniques (Mizushima et Kobayashi, 1968). Cette dénaturation est souvent associée à une inflammation ; par conséquent, l'inhibition de la dénaturation des protéines a été largement utilisée comme modèle de dépistage *in vitro* pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire (Chaiyana et al., 2017).

➤ **Mode opératoire**

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits méthanoliques étudiés a été évaluée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines décrite par Lavanya et *al.* (2010) avec quelques modifications.

- La solution à tester (0,5 ml) est constituée de 0,45 ml d'albumine de sérum bovine (BSA) (5%) et de 0,05 ml de solution à examiner (100 µg/ml).
- La solution de contrôle d'essai (0,5 ml) est constituée de 0,45 ml du BSA (5%) et de 0,05 ml d'eau distillée.
- La solution standard (0,5 ml) est constituée de 0,45 ml du BSA (5%) et 0,05 ml d'indométacine (100 µg/ml).

Toutes les solutions ont été ajustées à pH 6,3 en utilisant du HCl 1N. Les échantillons ont été incubés à 37° C pendant 20 minutes puis à 57°C pendant 3 minutes. Après refroidissement, 2,5 ml de tampon phosphate ajusté à pH 6,3 ont été ajoutés à chaque tube. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre de type (Spectro® 50 plus) à 416 nm. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{A du contrôle} - \text{A de la solution test}) \times 100 / (\text{A du contrôle})$$

➤ **Détermination de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀)**

Pour chaque extrait ou anti-inflammatoire de référence, une courbe de régression linéaire ($Y = aX + b$) est établie afin de calculer l'IC₅₀ qui permettra la caractérisation de la capacité inhibitrice de la dénaturation de BSA des extraits.

I.5.2. Stabilisation de la membrane des globules rouges

➤ **Principe**

Si les globules rouges (GR) sont exposés à des substances nuisibles telles que le milieu hypotonique, la rupture de leurs membranes se produira ; provoquant ainsi la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant. L'effet hémolytique de la suspension hypotonique est lié à l'accumulation excessive du liquide dans la cellule (Rahman et *al.*, 2015 ; Labu et *al.*, 2015). L'hémolyse est détectée visuellement en montrant une teinte rose à rouge dans le sérum ou le plasma. Dans notre étude, la stabilisation de la membrane des globules rouges est effectuée par l'inhibition de l'hypotonicité (Rahman et *al.*, 2015 ; Shobana et Vidhya, 2016).

➤ Mode opératoire

Stabilisation de la membrane des globules rouges a été réalisée selon le procédé de (Kosala et al., 2018) avec des légères modifications.

• Préparation de la suspension de globules rouges

Le sang a été prélevé sur un volontaire humain en bonne santé qui n'a pas pris d'AINS pendant 2 semaines avant l'expérience. Le sang recueilli a été mélangé à un volume égal de solution d'Alsever stérilisée (2 % de glucose, 0,8 % de citrate de sodium, 0,5 % d'acide citrique et 0,42 % de chlorure de sodium dans de l'eau). Ensuite, le mélange a été centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min. Le culot a été lavé trois fois avec de l'eau physiologique (0,9 %) et le volume du sang a été mesuré et reconstitué sous forme de suspension à 10 % v/v avec de l'eau physiologique.

• Hémolyse induite par des fluides hypotoniques et la chaleur

Le mélange de dosage contenant 1 ml de tampon phosphate (pH 7,4, 0,15 M), 2 ml d'hyosaline (0,42 %), 0,5 ml de la suspension de globules rouges (10 %) avec 0,5 ml des deux extraits (feuille et fruit) ou du médicament standard diclofenac à différentes concentrations (25- 200 µg/ml) et le contrôle (eau distillée au lieu des extraits ou médicament pour produire une hémolyse à 100 %) ont été incubés à 56°C pendant 30 min au bain-marie puis centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. Les surnageants sont récupérés et les absorbances sont lues à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type (Spectro® 50 plus). Le pourcentage de protection contre la stabilité de la membrane a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Le pourcentage de stabilisation (\%)} = \frac{(\text{A du contrôle} - \text{A de la solution test}) \times 100}{(\text{A du contrôle})}$$

➤ Détermination de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀)

Les IC₅₀ des extraits pour 50% d'inhibition sont calculés de la même manière qu'au cours du test de la dénaturation de protéines.

I.6. Analyse statistique

Les résultats des différentes évaluations sont donnés sous forme de moyenne ± écart types. Toutes les déterminations ont été réalisées en triple exemplaire et les données ont été analysées par ANOVA suivie d'une multiple comparaison de Tukey-Kramer HSD (Logiciel JMP, Version 7,0) avec un niveau de signification de 0,05.

II. Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Rendements des extraits bruts

Les rendements obtenus pour les deux extraits de la plante étudiée *Ceratonia seliqua*, exprimés en pourcentage par rapport au poids du matériel végétal sec de départ, sont représentés dans la figure 14.

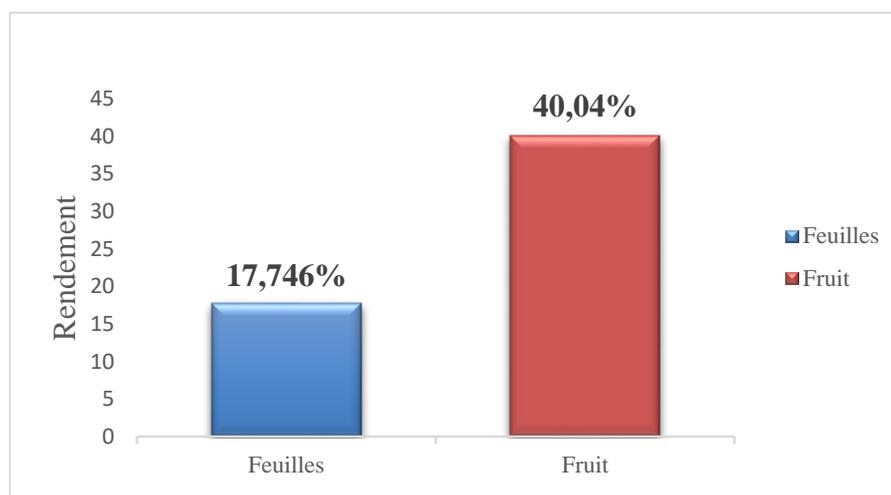


Figure 14 : Rendements des deux extraits méthanoliques de *Ceratonia seliqua* en pourcentage.

Les résultats obtenus montrent que le rendement des extraits méthanoliques varie d'une partie de la plante à une autre. Nous constatons que l'extrait de fruit donne le meilleur rendement soit 40,04 % contre 17.74 % pour les feuilles.

Selon Spizzirri et ses collaborateurs (2022), les rendements des extraits des feuilles de deux variétés de *Ceratonia seliqua* (Amele et selvatica) récoltées dans la région sud de l'Italie étaient de 14.7 % et 7 % respectivement en utilisant une extraction par ultrasons dans l'éthanol. D'après les résultats de Rtibi et al. (2016), le rendement d'extrait aqueux des feuilles collectées dans la région de Tabarka (Nord-Ouest de la Tunisie) était de 10 %. Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus dans notre étude. Dans l'étude d'Ydjedd et al. (2017), le rendement d'extraction de fruit de caroubier cultivé à Bejaia (Algérie) était de 0,80 % pour l'extraction par acétate d'éthyle contre 53,06 % pour l'extraction par acétone 70 %. Une autre étude réalisée par Alabdallat et Bילו (2013) sur le fruit de *Ceratonia seliqua* collecté en Jordanie a montré un rendement de 23.2 % en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. Cette variabilité de rendement dépend strictement de la polarité de solvant, des techniques d'extraction, de la température, la pression, le temps ainsi que de la composition chimique de l'échantillon.

II.2. Etude phytochimique

Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche des nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques. Cela n'est abordable que par faire d'abord un appel à l'analyse phytochimique qui va permettre d'identifier et de quantifier les différents groupes chimiques présents dans l'extrait de plantes.

II.2.1. Teneurs en polyphénols totaux

Les résultats des dosages des polyphénols totaux des deux extraits de *Ceratonia seliqua* exprimés en mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait brut de la plante (mg EAG/g EB) en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Annexe 1) sont présentés dans la figure 15.

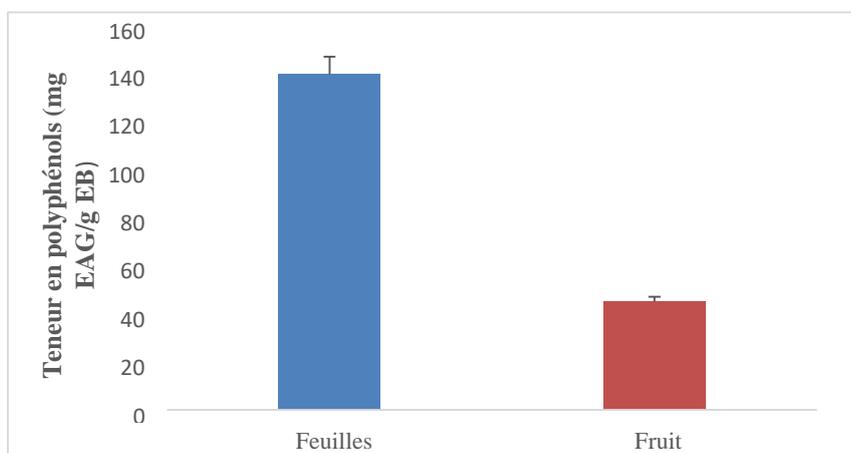


Figure 15 : Teneur en polyphénols des feuilles et fruit de *Ceratonia seliqua*

Nos résultats montrent que l'extrait des feuilles de *Ceratonia seliqua*, possède la plus haute teneur en polyphénols ($141,688 \pm 7,396$ mg EAG/g EB) par rapport à celui des fruits qui a présenté une teneur de $45,597 \pm 2,203$ mg EAG/gEB.

L'étude menée par Abidar et al. (2020) sur l'extrait aqueux des feuilles de *Ceratonia seliqua* a montré que la teneur en polyphénols totaux était de $52,95 \pm 0,141$ mg EAG/g Poids Sec. Ainsi, dans l'étude de Hsouna et al. (2011), la teneur des polyphénols dans l'extrait brut de feuilles/fraction d'eau était de $130 \pm 5,62$ mg EAG/g PS. Une autre étude réalisée par Custódio et al. (2015) à montrer que la teneur en polyphénols de décoction des feuilles était de 65 mg EAG/g PS. Les résultats obtenus dans le travail de Spizzirri et ses collaborateurs (2022) réalisé sur deux variétés de caroubier par différentes techniques d'extraction étaient variés entre $29,22 \pm 0,17$ et $313,04 \pm 0,36$ mg EAG/g PS.

En ce qui concerne le fruit de *Ceratonia siliqua*, une étude effectuée par Roseiro et *al.* (2013) a montré que la teneur en polyphénols varie entre 5.8 ± 0.3 et 20.4 ± 1.8 mg EAG/g PS en dépend de la méthode et le solvant d'extraction. D'après l'étude de Makris et Kefalas (2004), la teneur en polyphénols d'extrait méthanolique était de 3.38 ± 0.52 mg EAG/g PS. Custódio et *al.* (2015) ont montré que le taux des polyphénols était de 8.2 ± 0.1 mg EAG/g PS en utilisant la décoction.

II.2.2. Teneurs en flavonoïdes

La figure 16 résume les résultats obtenus pour les deux extraits exprimés en mg équivalent de la quercétine/g d'extrait brut de la plante (mg EQ/g EB) en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la quercétine (Annexe 2).

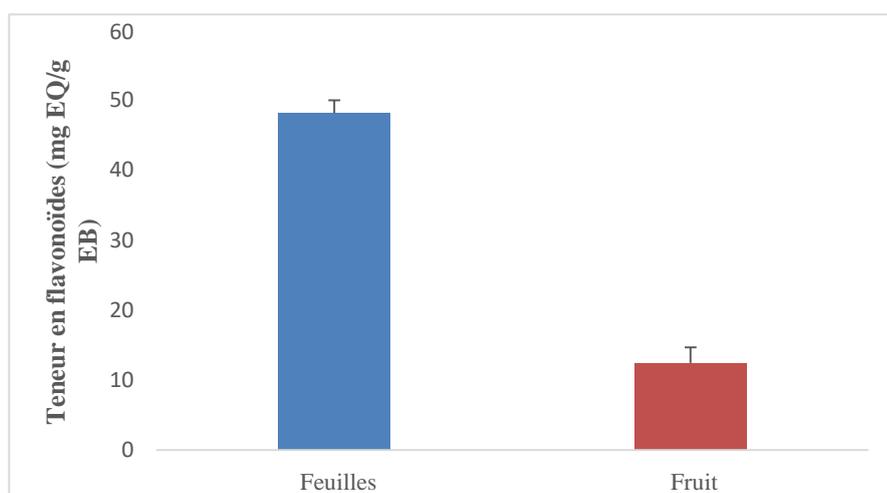


Figure 16 : Teneur en flavonoïdes des feuilles et fruit de *Ceratonia siliqua*

Selon les résultats illustrés ci-dessus, nous remarquons que l'extrait des feuilles de *Ceratonia siliqua* est aussi le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de $48,122 \pm 1,873$ mg EQ/g EB par rapport au fruit ($12,46 \pm 2,235$ mg EQ/g EB).

D'après le travail de Dallali et *al.* (2018) réalisés sur les feuilles de *Ceratonia siliqua* collectées de trois sites différents dans la région Nord-Est de la Tunisie, la teneur en flavonoïdes était de $3,42 \pm 0,55$ à $7,42 \pm 0,22$ mg EQ/g PS. Selon Abidar et *al.* (2020), la teneur en flavonoïdes d'extrait aqueux des feuilles était 25.35 ± 0.124 mg EQ/g PS. De plus, une étude réalisée par Hsouna et *al.* (2011) a montré des valeurs entre 21.71 ± 8.71 et 193.3 ± 3.07 mg EQ/g PS en utilisant quatre solvants d'extraction différents.

Pour le fruit de *Ceratonia siliqua*, une étude menée par Ydjedd et *al.* (2017) a montré une teneur en flavonoïdes de $1,52 \pm 0,14$ mg EQ/g PS en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction. Par ailleurs, une autre étude réalisée par Bentahar et *al.* (2012) a montré une teneur en flavonoïdes de $0,033 \pm 0,01$ mg EQ/g PS dont le solvant d'extraction était l'eau distillée. Selon les

résultats d'Anis et *al.* (2012) la teneur en flavonoïdes d'extrait méthanolique était 24.6 ± 2.4 mg EQ/g PS.

La différence dans le contenu phénolique y compris les flavonoïdes peut être attribuée à plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction et la méthode de quantification. Par ailleurs, les facteurs climatiques et environnementaux (la zone géographique, la sécheresse, température, altitude, ensoleillement et précipitation), la variété, l'origine, la période de la récolte et le stade de développement ainsi que les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante peuvent également influencer l'estimation de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes (Locatelli et *al.*, 2010 ; Bentahar et *al.*, 2012 ; Dallali et *al.*, 2018). Les facteurs génétiques et les conditions de croissance de la plante peuvent jouer un rôle important dans la formation de métabolites secondaires (Islam et *al.*, 2003).

II.3. Evaluation de l'activité antioxydant

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur l'activité antioxydant *in vitro* des extraits méthanoliques de *Ceratonia siliqua*. Cette activité a été évaluée par le test au DPPH, celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats, et le test de la chélation des ions métalliques du fer.

II.3.1. Activité antiradicalaire (DPPH)

Les profils de l'activité antiradicalaire des extraits méthanoliques des feuilles et des fruits de *Ceratonia siliqua* et celle de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) ont été testés par la méthode du DPPH à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 17.

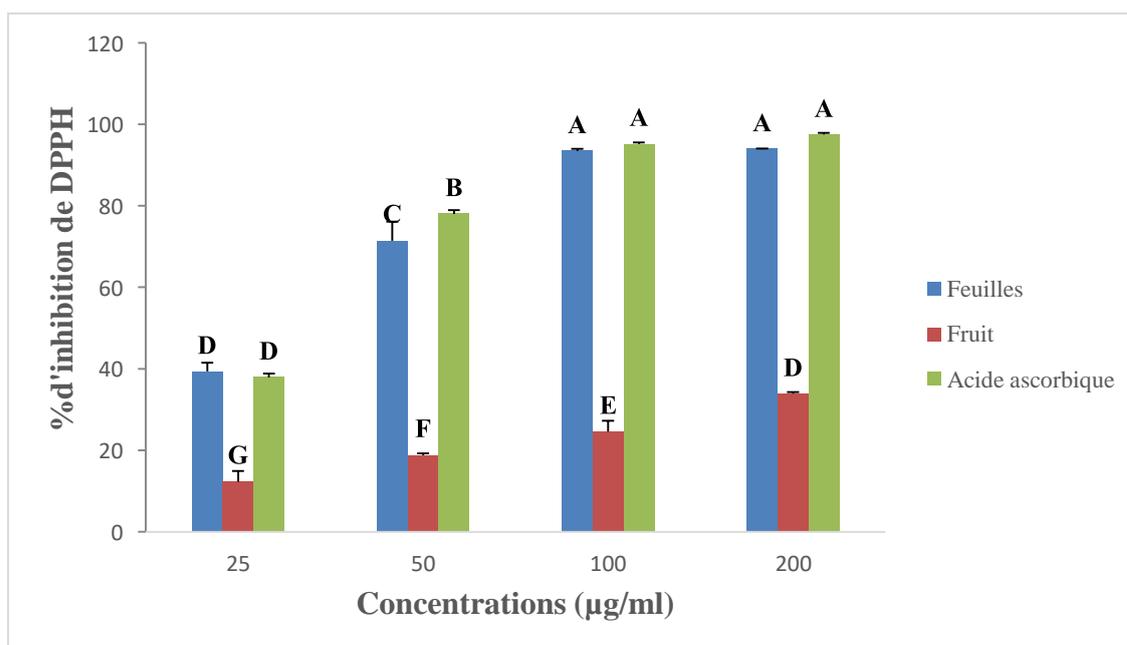


Figure 17 : Pouvoir réducteur DPPH des deux extrait et de standard exprimé en pourcentage. Les moyennes suivies d'une lettre différente sont significativement différentes ($p > 0,05$).

Selon les résultats obtenus dans cette étude, il est indiqué clairement que l'extrait des feuilles de la plante testée possède une forte activité antiradicalaire par rapport à l'extrait des fruits avec une différence significative ($p > 0,05$) ce qui est compatibles avec ses teneurs les plus élevées en composés phénoliques et en flavonoïdes.

D'après la figure 17, nous remarquons que les pourcentages d'inhibition augmentent au fur et à mesure que la concentration des deux extraits et du standard augmente. Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH des deux extraits de la plante étudiée varient entre $39,361 \pm 2,086$ et $93,987 \pm 0,176$ pour les feuilles, et $12,303 \pm 2,675$ et $33,909 \pm 0,384$ pour les fruits. En revanche, nous n'observons aucune différence significative ($p < 0,05$) entre les pourcentages d'inhibition de l'extrait des feuilles et du standard (acide ascorbique) à partir de la concentration $100 \mu\text{g/ml}$. En effet, l'extrait des feuilles donne un effet antioxydant très important similaires à l'acide ascorbique.

➤ Détermination de l'IC₅₀

Les valeurs d'IC₅₀ trouvées pour les extraits étudiés ainsi que le standard sont représentées dans le tableau IV.

Tableau IV : IC₅₀ du standard et des extraits des feuilles et fruit de *Ceratonia seliqua* de l'activité antiradicalaire DPPH.

Echantillons	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait des feuilles	28,87±1,16
Extraits de fruit	1073,45±128,61
Acide ascorbique	26,95±0,90

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que l'effet scavenger du radical DPPH le plus fort est obtenu avec l'extrait des feuilles (IC₅₀=28,87±1,16 µg/ml). Par contre, l'extrait des fruits a présenté l'effet scavenger le plus faible (IC₅₀= 1073,45±128,61 µg/ml). En comparaison avec l'antioxydant standard (l'acide ascorbique) qui a démontré un IC₅₀ de 26,95±0,90 µg/ml, nous constatons que l'extrait des feuilles possède une activité antioxydant similaire au standard contrairement à l'extrait des fruits.

L'étude d'Anis *et al.* (2012) a montré que les feuilles de *Ceratonia seliqua* ont un effet scavenger des radicaux libres DPPH (IC₅₀) de 41.01, 1.80 et 8.65 µg/ml en utilisant dichloromethane, acétate d'éthyl et l'eau comme solvants d'extraction respectivement. L'étude menée par Custódio *et al.* (2009) sur six variétés portugaises femelles de *Ceratonia seliqua* a montré que l'IC₅₀ de l'extrait des feuilles était varié entre 94.6 et 273.2 µg/ml.

Selon Ydjedd *et al.* (2017) l'IC₅₀ de l'extrait de fruit était 992,04 et 795,32 µg/ml dont les solvants d'extraction étaient l'acétate d'éthyle et l'acétone respectivement. Une autre étude a montré des activités radicalaires de l'ordre de 165,08 et 1618,70 µg/ml pour les extraits par acétate d'éthyle et éther diéthylique (Gregoriou *et al.* 2021).

Ces résultats montrent que l'activité antiradicalaire vis-à-vis de radical DPPH est influencée par le choix de solvant d'extraction et elle est corrélée avec le taux des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits des plantes (Mariod *et al.*, 2009 ; Locatelli *et al.*, 2010). Les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur structure chimique idéale (Turkmen *et al.*, 2007). La forte activité antioxydant des feuilles de *Ceratonia seliqua* serait donc liée à leur forte teneur en phénols totaux et en flavonoïdes par rapport au fruit. La capacité de piégeage du DPPH des extraits végétaux augmente lorsque le niveau des groupements OH- présents dans les cycles aromatiques augmente (Shahwar *et Raza*, 2012). Cependant, d'autres composés non phénoliques présents dans les extraits peuvent avoir un effet antioxydant (Gonçalves *et al.*, 2013).

II.3.2. Pouvoir réducteur du Fer

Les résultats du pouvoir réducteur du fer des deux extraits de *Ceratonia seliqua* et du standard sont présentés dans la figure 18.

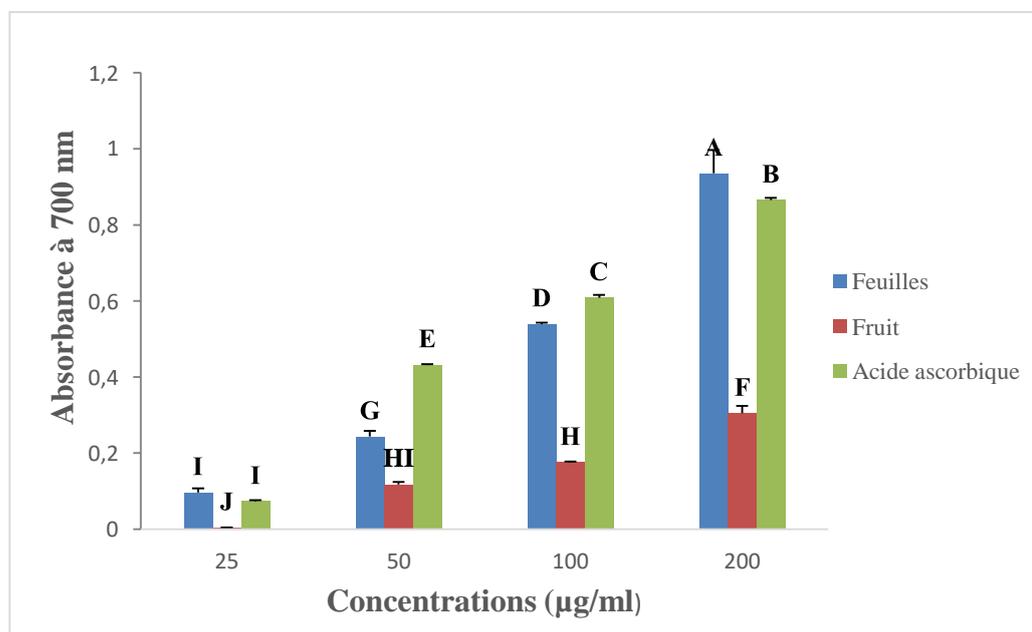


Figure 18 : Pouvoir réducteur du Fer des deux extraits et du standard.

D'après les résultats représentés dans la figure 18, nous constatons que la capacité de réduire les ions Fe^{3+} par les deux extraits étudiés est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons. La capacité réductrice de l'extrait des feuilles varie entre $0,096 \pm 0,011$ et $0,935 \pm 0,061$ par contre celle de l'extrait de fruit varie entre $0,0036 \pm 0,00057$ et $0,304 \pm 0,02$. L'analyse statistique de pouvoir réducteur de Fer des deux extraits révèle une différence significative ($p > 0,05$) en faveur de l'extrait des feuilles.

En effet, la capacité de l'extrait des feuilles à réduire le fer est proche de celle de l'acide ascorbique qui a présenté des valeurs entre $0,07 \pm 0,035$ et $0,865 \pm 0,006$ avec une réduction maximale obtenue à la concentration 200 µg/ml. A cette concentration, l'extrait des feuilles a présenté une activité supérieure à celle de l'acide ascorbique.

La chélation des métaux de transition présente l'une des principales stratégies utilisées pour étudier l'activité antioxydant des extraits de plantes (Mathew et Abraham, 2006). Les ions de métaux de transition jouent un rôle essentiel dans le processus d'oxydation via la réaction de Fenton (Hinneburg et al., 2006).

Notre résultat montre qu'il existe une bonne corrélation entre le pouvoir réducteur des extraits de *Ceratonia seliqua* et leurs teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Les feuilles

présentent le pouvoir réducteur le plus élevé par rapport au fruit, cela est due vraisemblablement à leur teneur élevée en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est dû à leur potentiel redox élevé, qui permet d'interagir en tant que donneurs d'hydrogène, réducteurs et extincteurs d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Loizzo et al., 2009). La structure des composés phénoliques est également impliquée dans leur activité antioxydant. En effet, la présence de groupements hydroxyles dans les cycles aromatiques des flavonoïdes en position 3', 4' et 5' augmente leur pouvoir antioxydant. De plus, les composés phénoliques avec deux groupements hydroxyle adjacents peuvent participer au processus de chélation des ions de métaux de transition tels que le fer et le cuivre (Miguel et al., 2010).

II.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Dans notre étude l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits méthanoliques de *Ceratonia siliqua* a été évaluée par deux méthodes ; un test d'inhibition de la dénaturation thermique du BSA et un test de stabilisation membranaire de globules rouges humains.

II.4.1. Effet sur la dénaturation protéique

Pour évaluer la propriété anti-inflammatoire de nos extraits à différentes concentrations, nous avons réalisé *in vitro* un test d'inhibition de la dénaturation thermique du BSA. Les résultats obtenus (Figure 19) ont été ensuite comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions pour l'anti-inflammatoire commerciale le diclofenac sodium.

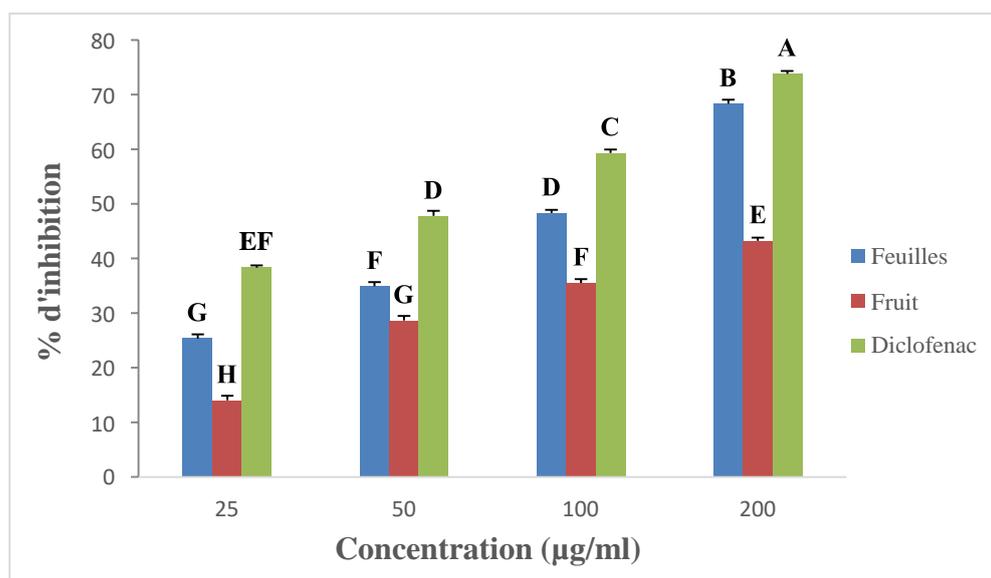


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique des deux extraits comparé au standard.

Les résultats de cette figure révèlent que les deux extraits testés, ont protégé la BSA contre la dénaturation induite. Les pourcentages de cette protection ont été augmentés avec des concentrations croissantes et de manière dépendante de celles-ci.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation par l'extrait de feuilles est supérieur comparativement à l'extrait de fruit et proche à celle de l'anti-inflammatoire de référence (diclofenac).

À la concentration 100 µg/ml, l'extrait de feuilles inhibe la dénaturation du BSA de manière similaire au diclofenac à la concentration 50 µg/ml avec aucune différence significative ($p < 0,05$).

➤ Détermination de l'IC₅₀

Les valeurs d'IC₅₀ trouvées pour les extraits étudiés ainsi que le standard sont représentées dans le tableau V.

Tableau V : IC₅₀ du standard et des extraits des feuilles et fruit de *Ceratonia siliqua* de la dénaturation protéique.

Echantillons	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait des feuilles	102,01±2,66
Extraits de fruit	368,3±6,86
Diclofenac	54,59±1,45

D'après les résultats de tableau ci-dessus, l'effet inhibiteur de la dénaturation de BSA le plus fort a été obtenu avec l'extrait brut des feuilles qui a révélé une valeur IC₅₀ de 102,01±2,66 µg/ml (presque le double du standard utilisé). Par contre l'extrait de fruit a présenté l'effet le plus faible avec une valeur IC₅₀ de 368,3±6,86 µg/ml. Alors les deux extraits sont moins actifs par rapport au médicament de référence ; le diclofenac (54,59±1,45 µg/ml).

La dénaturation des protéines a été provoquée par l'application d'un stress externe : un composé comme un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou avec la chaleur. C'est un processus dans lequel les protéines perdent leurs structures tertiaires et secondaires ainsi que leurs fonctions biologiques (Sivaraj et al., 2017). La dénaturation des protéines est l'une des causes de l'inflammation. La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation *in vivo* des protéines. Le mécanisme de dénaturation implique éventuellement une altération des liaisons électrostatiques, hydrogène, hydrophobes et disulfure (Kar et al., 2012).

D'après nos résultats, nous constatons que les deux extraits bruts (feuilles et fruit) de *Ceratonia seliqua* étaient capables de contrôler la dénaturation des protéines et donc d'inhiber la production d'auto- antigènes. L'activité inhibitrice de la dénaturation de la BSA peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes dans les extraits. On peut conclure que les extraits bruts possèdent un effet anti-inflammatoire.

II.3.2.2. Stabilisation de la membrane des globules rouges

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits brut des feuilles et fruit de *Ceratonia seliqua*, un test de stabilisation membranaire de globules rouges humains a été réalisé. Ce test consiste à incuber une suspension de globules rouges humains, traitée avec une solution hypotonique associée à une température élevée, avec les extraits ou les molécules de références (diclofenac comme anti-inflammatoire). Les résultats sont représentés dans la figure 20.

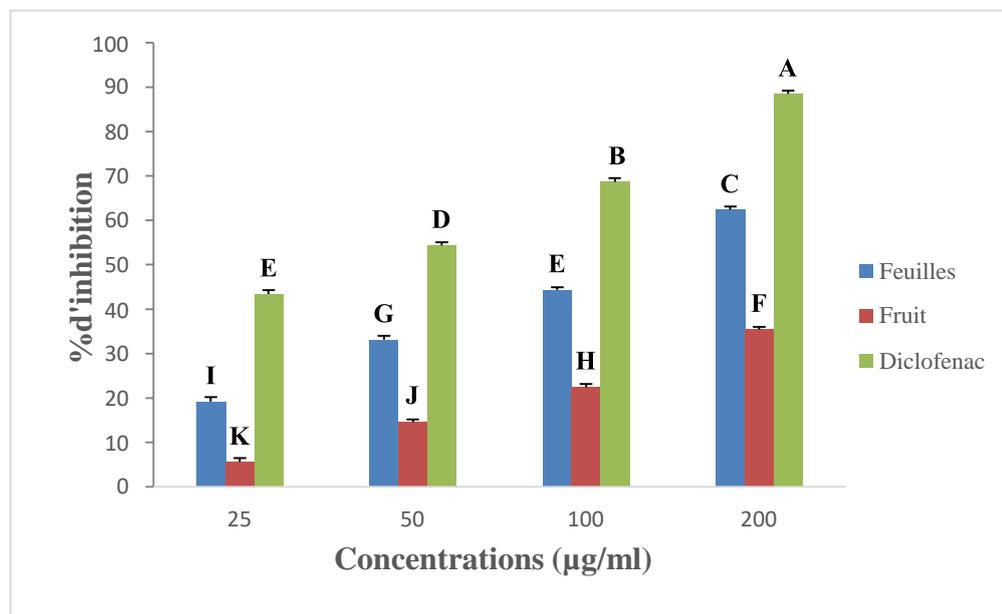


Figure 20 : Pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges traités par l'extrait brut des feuilles et fruit de *Ceratonia seliqua* et diclofenac.

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits de la plante étudiée présentent une réduction de l'hémolyse des globules rouges, avec un effet concentration dépendant.

Les deux extraits testés ont assurés aux globules rouges humains une protection contre l'hémolyse hypotonique qui était inférieure à celle de la molécule de référence (diclofenac). L'activité inhibitrice de l'extrait de fruit (de $5,57 \pm 0,89$ à $35,44 \pm 0,56$) est plus faible par rapport à l'activité de l'extrait de feuilles (de $19,19 \pm 0,99$ à $62,38 \pm 0,71$). Les deux extraits présente une différence significative ($p > 0,05$).

➤ **Détermination de l'IC₅₀**

Les valeurs d'IC₅₀ trouvées pour les extraits étudiés ainsi que le standard sont représentées dans le tableau VI.

Tableau VI : IC₅₀ du standard et des extraits des feuilles et fruit de *Ceratonia seliqua* de stabilisation de la membrane des globules rouges.

Echantillons	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait des feuilles	130,16±3,20
Extraits de fruit	798,74±8,60
Diclofenac	37,22±1,56

Le tableau montre que l'extrait de fruit présente la plus grande IC₅₀ (798,74±8,60 µg/ml) donc il révèle la plus faible activité anti-hémolytique par rapport à celle de feuilles qui indique une IC₅₀ égale à 130,16±3,20 µg/ml et assure une protection importante mais qui reste inférieure à l'activité de diclofenac (37,22±1,56 µg/ml).

La stabilisation membranaire a été utilisée comme méthode pour étudier l'activité anti-inflammatoire in vitro car la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale et sa stabilisation implique que l'extrait peut bien stabiliser les membranes lysosomales. La stabilisation des lysosomes est importante pour limiter la réponse inflammatoire en empêchant la libération des constituants lysosomal des neutrophiles activés, tels que les enzymes bactériennes et les protéases, ce qui provoque une inflammation et des dommages tissulaires supplémentaires lors de la libération extracellulaire (Leelaprakash et Dass, 2011).

D'après les résultats de notre expérimentation l'extrait des feuilles présente une stabilisation de la membrane érythrocytaire plus importante que l'extrait de fruit. Cette activité peut être due à la forte présence des polyphénols et flavonoïdes qui ont des propriétés anti-inflammatoires.

Conclusion

Les thérapies médicinales traditionnelles ont été pratiquées pendant des siècles. Au cours des dernières décennies, de nombreux efforts ont donc été consacrés à l'utilisation de différentes espèces végétales en raison de leurs activités pharmacologiques puissantes. Une grande partie de l'effet thérapeutique des plantes médicinales a été attribuée aux métabolites secondaires des plantes tels que les polyphénols qui ont démontré des actions antioxydantes anti-inflammatoires...etc. L'objectif de notre travail était l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydant et anti-inflammatoire *in vitro* des extraits bruts de deux parties aériennes (feuilles et fruit) de la plante *Ceratonia siliqua*.

L'extraction des composés phénoliques des deux parties de la plante par macération a fourni des rendements variables. Le taux le plus élevé a été enregistré avec l'extrait de fruit avec une valeur de 40,04%.

D'après l'étude phytochimique, nous constatons que les feuilles étaient les plus riches en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes avec des valeurs de $141,688 \pm 7,396$ mg EAG/g EB et $48,122 \pm 1,873$ mg EQ/g EB respectivement, par rapport au fruit qui a présenté des teneurs plus faibles de l'ordre de $45,597 \pm 2,203$ mg EAG/g EB et $12,46 \pm 2,235$ mg EQ/gEB respectivement.

L'activité antioxydante des deux extraits testés a été évaluée par deux techniques ; l'activité antiradicalaire au DPPH et le pouvoir réducteur du Fer. L'activité antioxydant varie selon l'extrait méthanolique testé et les extraits exercent une activité dose- dépendante. Pour les deux tests, les résultats ont révélé que les feuilles présentent l'activité la plus élevée par rapport au fruit.

Concernant l'activité anti-inflammatoire *in vitro*, elle a été évaluée par deux méthodes la première est de l'inhibition de la dénaturation du BSA et la deuxième par la stabilisation des membranes des globules rouge humaines. Ces tests ont montrés aussi que l'extrait brut des feuilles ont présenté une activité anti-inflammatoire puissante vis-à-vis la dénaturation des protéines (BSA), et un effet protecteur contre l'hémolyse de membrane des globules rouges important par rapport à l'extrait de fruit qui était moins actif.

D'après nos résultats, nous pouvons conclure qu'il y a une corrélation positive entre la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des deux extraits. Les résultats obtenus constituent une justification scientifique de l'usage traditionnel de *Ceratonia siliqua*.

Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets antioxydants et anti-inflammatoires. Ces études doivent être aussi orientées vers la détermination des composés actifs dans les extraits de *Ceratonia siliqua* responsables de ces effets.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Abidar, S., Boianiu, R. S., Dumitru, G., Todirascu-Ciornea, E., Amakran, A., Cioanca, O., ... & Nhiri, M. (2020).** The aqueous extract from *Ceratonia siliqua* leaves protects against 6-hydroxydopamine in zebrafish: understanding the underlying mechanism. *Antioxidants*, 9(4), 1-21.
- Adcock, I. M. (2000).** Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 13(3), 115-126.
- Alabdallat, N. G., & Bילו, Y (2013).** Antioxidant properties of selected wild plants. *International Journal of Science and Research*, 4(2), 197-200.
- Anis, B. H., Abdullah, S. A., & Emad, M. A. (2012).** Evaluation of antimicrobial activities of crude methanolic extract of pods of *Ceratonia siliqua* L. against some pathogens and spoilage bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 6(14), 3480-3484.
- Antman, E. M., Bennett, J. S., Daugherty, A., Furberg, C., Roberts, H., & Taubert, K. A. (2007).** Use of non steroidal antiinflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 115(12), 1634-1642.
- Ashley, N. T., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2012).** Inflammation : mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 43(385), 384-406.
- Aslani, B. A., & Ghobadi, S. (2016).** Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life sciences*, 146, 163-173.
- Balasundram, N., Tan, Y. A., Sambanthamurthi, R., Sundram, K., & Samman, S. (2005).** Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 14(4), 319-324.
- Barnes, P. J. (1998).** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science*, 94(6), 557-572.
- Battu, G. R., Ethadi, S. R., Priya, G. V., Priya, K. S., Chandrika, K., Rao, A. V., & Reddy, S. O. (2011).** Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of *Euphorbia heyneana* Spreng. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 191-194.
- Baudin, B. (2020).** Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020(522), 22-30.

- Benmahioul, B., Harche, M. K., & Daguin, F. (2011).** Le caroubier, une espèce méditerranéenne à usages multiples. *Forêt méditerranéenne*, 32(1), 51-58.
- Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.
- Bentahar, A., Khennouf, S., Bouaziz, A., & Djidel, S. (2012).** Evaluation de la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits aqueux des *Ceratonia siliqua* L. et *Ruta montana* L. In *Proceeding of the 2nd African Congress on Biology & Health University Ferhat Abbas Setif1*, 11, 30-34.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012).** Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5(1), 9-19.
- Biswas, S. K. (2016).** Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 1-9.
- Blain, H., Jouzeau, J. Y., Netter, P., & Jeandel, C. (2000).** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *La revue de médecine interne*, 21(11), 978-988.
- Boublenza, I., Ghezlaoui, S., Mahdad, M., Vasai, F., & Chemat, F. (2019).** Algerian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations. Morphological and chemical variability of their fruits and seeds. *Scientia Horticulturae*, 256, 1-8.
- Brassesco, M. E., Brandão, T. R., Silva, C. L., & Pintado, M. (2021).** Carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) : A new perspective for functional food. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 310-322.
- Brune, K., & Patrignani, P. (2015).** New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of pain research*, 8, 105-118.
- Canaud, B., Sénécal, L., Leray-Moragués, H., Picard-Gontiers, A., Terrier, N., Morena, M., & Cristol, J. P. (2003).** L'accès vasculaire, une cause d'inflammation sous-estimée chez l'hémodialysé. *Néphrologie*, 24(7), 353-358.

- Chaiyana, W., Anuchapreeda, S., Leelapornpisid, P., Phongpradist, R., Viernstein, H., & Mueller, M. (2017).** Development of microemulsion delivery system of essential oil from Zingiber cassumunar Roxb. rhizome for improvement of stability and anti-inflammatory activity. *AAPS PharmSciTech*, 18(4), 1332-1342.
- Chebira, M., & Boudjaadar, W. (2014).** Contribution à la mise en évidence de nouveaux anti-inflammatoires par dockingmoléculaire. *Biochimie moléculaire et sante*, 62(24), 1136-1148.
- Chen, Z., Bertin, R., & Froidi, G. (2013).** EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food chemistry*, 138(1), 414-420.
- Corsi, L., Avallone, R., Cosenza, F., Farina, F., Baraldi, C., & Baraldi, M. (2002).** Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, 73(7-8), 674-684.
- Custódio, L., Fernandes, E., Escapa, A. L., López-Avilés, S., Fajardo, A., Aligué, R., ... & Romano, A. (2009).** Antioxidant activity and *in vitro* inhibition of tumor cell growth by leaf extracts from the carob tree (*Ceratonia siliqua*). *Pharmaceutical biology*, 47(8), 721-728.
- Custódio, L., Patarra, J., Alberício, F., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., & Romano, A. (2015).** *In vitro* antioxidant and inhibitory activity of water decoctions of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) on cholinesterases, α -amylase and α -glucosidase. *Natural product research*, 29(22), 2155-2159.
- Dakia, P. A. (2011).** Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Seeds, endosperm and germ composition, and application to health. *In Nuts and seeds in health and disease prevention*, 293-299.
- Dallali, S., Aloui, F., Selmi, H., & Sebei, H. (2018).** Comparison of the chemical composition and the antioxidant activity of the leaves of Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) collected in three sites of Djebel Zaghouan (Tunisia). *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, CIRIS (21)*, 3429-3438.
- Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2022).** Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 209, 1-26.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002).** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3010-3014.

- Durand, D., Damon, M., & Gobert, M. (2013).** Oxidative stress in farm animals: General aspects. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48, 218-224.
- Fatima, A., Asma, G., & Sana, A. (2021).** Antibacterial properties of *Ceratonia siliqua* L. ethanolic extract and *Artemisia herba alba* essential oil. *Academia Letters*, 2, 1-15.
- Favier, A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises*, 64(6), 390-396.
- Fialho, L., Santa-maria, A. F., Madureira, F. A., & Iglesias, A. C. (2018).** Comparative study of systemic early postoperative inflammatory response among elderly and non-elderly patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 45, 1-7.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006).** Oxidative stress. *Sports medicine*, 36(4), 327-358.
- Ghanemi, F. Z., & Belarbi, M. (2021).** Phytochemistry and Pharmacology of *Ceratonia siliqua* L. leaves. *Journal of Natural Product Research and Applications*, 1(01), 69-82.
- Golbashirzadeh, M., Heidari, H. R., & Khosroushahi, A. Y. (2022).** Molecular mechanisms of reactive oxygen species in regulated cell deaths: Impact of ferroptosis in cancer therapy. *Gene Reports*, 101614, 1-15.
- Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P., & Romano, A. (2013).** The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 43, 465-471.
- Gregoriou, G., Neophytou, C. M., Vasincu, A., Gregoriou, Y., Hadjipakkou, H., Pinakoulaki, E., ... & Constantinou, A. I. (2021).** Anti-cancer activity and phenolic content of extracts derived from cypriot carob (*Ceratonia siliqua* L.) pods using different solvents. *Molecules*, 26(16), 1-22.
- Greig, F. H., Kennedy, S., & Spickett, C. M. (2012).** Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(2), 266-280.
- Gugliuzzo, A., Mazzeo, G., Mansour, R., & Tropea Garzia, G. (2019).** Carob pests in the Mediterranean region: bio-ecology, natural enemies and management options. *Phytoparasitica*, 47(5), 605-628.

- Gurib-Fakim, A. (2006).** Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Heilerová, L., Bučková, M., Tarapčík, P., Šilhár, S., & Labuda, J. (2003).** Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), and agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by conventional methods and the DNA-based biosensor. *Czech journal of food sciences*, 21(2), 78-84.
- Hernández-García, D., Wood, C. D., Castro-Obregón, S., & Covarrubias, L. (2010).** Reactive oxygen species: a radical role in development?. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2), 130- 143.
- Hinneburg, I., Dorman, H. D., & Hiltunen, R. (2006).** Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food chemistry*, 97(1), 122-129.
- Hirayama, D., Iida, T., & Nakase, H. (2017).** The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 1-14.
- Hseu, Y. C., Chang, W. H., Chen, C. S., Liao, J. W., Huang, C. J., Lu, F. J., ... & Yang, H. L. (2008).** Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food and chemical toxicology*, 46(1), 105-114.
- Hsouna, A. B., Saoudi, M., Trigui, M., Jamoussi, K., Boudawara, T., Jaoua, S., & El Feki, A. (2011).** Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of *Ceratonia siliqua* leaf extract against CCl₄ induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Food and chemical toxicology*, 49(12), 3183-3191.
- Huang, D. J., Chun-Der, L. I. N., Hsien-Jung, C. H. E. N., & Yaw-Huei, L. I. N. (2004).** Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] LamTainong 57') constituents. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45, 170-186.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018).** First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.

- Islam, M. S., Yoshimoto, M., Ishiguro, K., Okuno, S., & Yamakawa, O. (2003).** Effect of artificial shading and temperature on radical scavenging activity and polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(2), 182-187.
- Kar, B., Kumar, R. S., Karmakar, I., Dola, N., Bala, A., Mazumder, U. K., & Hadar, P. K. (2012).** Antioxidant and *in vitro* anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 976-980.
- Kosala, K., Widodo, M. A., Santoso, S., & Karyono, S. (2018).** *In vitro* and *In vivo* Anti-inflammatory Activities of *Coptosapelta flavescens* Korth Root's Methanol Extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(09), 042-048.
- Krokou, A., Stylianou, M., & Agapiou, A. (2019).** Assessing the volatile profile of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(35), 35365-35374.
- Labu, Z. K., Laboni, F. R., Tarafdar, M., Howlader, M. S. I., & Rashid, M. H. (2015).** Membrane stabilization as a mechanism of anti-inflammatory and thrombolytic activities of ethanolic extract of arial parts of *Spondiasis pinanata* (family: Anacardiaceae). *Pharmacologyonline*, 2, 44-51.
- Lachkar, N., Al-Sobarry, M., El Hajaji, H., Lamkinsi, T., Lachkar, M., Cherrah, Y., & Alaoui, K. (2016).** Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Ceratonia siliqua* L. methanol barks extract. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8, 202-210.
- Lakkab, I., Hajaji, H. E., Lachkar, N., Bali, B. E., Lachkar, M., & Ciobica, A. (2018).** Phytochemistry, bioactivity: suggestion of *Ceratonia siliqua* L. as neurodegenerative disease therapy. *Journal of complementary & integrative medicine*, 15(4), 1-9
- Lavanya, R., Maheshwari, S. U., Harish, G., Raj, J. B., Kamali, S., Hemamalani, D., ... & Reddy, C. U. (2010).** Investigation of *in-vitro* anti-inflammatory, anti-platelet and anti-arthritic activities in the leaves of *Anisomeles malabarica* Linn. *Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*, 1(4), 745-752.
- Leelaprakash, G., & Dass, S. M. (2011).** *In vitro* anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(3), 189-196.

- Liu, R., Xu, Y., Zhang, T., Gong, M., Liu, R., Chang, M., & Wang, X. (2022).** Interactions between liposoluble antioxidants: a critical review. *Food Research International*, *155*, 1-14.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017).** NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, *2*(1), 1-9.
- Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J. D., Martelli, A., Stévigny, C., & Arlorio, M. (2010).** Total antioxidant activity of hazelnut skin (*Nocciola Piemonte* PGI): Impact of different roasting conditions. *Food chemistry*, *119*(4), 1647-1655.
- Loizzo, M. R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U. W., Rashed, K., Menichini, F., ... & Menichini, F. (2009).** Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant foods for human nutrition*, *64*(4), 264-270.
- Löwenberg, M., Verhaar, A. P., van den Brink, G. R., & Hommes, D. W. (2007).** Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends in molecular medicine*, *13*(4), 158-163.
- Makris, D. P., & Kefalas, P. (2004).** Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technology and Biotechnology*, *42*(2), 105-108.
- Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., & Ismail, N. (2009).** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, *116*(1), 306-312.
- Mathew, S., & Abraham, T. E. (2006).** *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and Chemical Toxicology*, *44*(2), 198-206.
- McGarry, T., Biniiecka, M., Veale, D. J., & Fearon, U. (2018).** Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, *125*, 15-24.
- Medzhitov, R. (2008).** Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*(7203), 428- 435.
- Miguel, M. G., Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M., & Antunes, M. D. (2010).** Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(12), 3418-3423.

- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012).** Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- Mizushima, Y., & Kobayashi, M. (1968).** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 169-173.
- Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J. P., & Canaud, B. (2002).** Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, 23(5), 201-208.
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012).** Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(3), 1-19.
- Noack, M., & Kolopp-Sarda, M. N. (2018).** Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2018(499), 28-37.
- Nunes, C. D. R., Barreto Arantes, M., Menezes de Faria Pereira, S., Leandro da Cruz, L., de Souza Passos, M., Pereira de Moraes, L., ... & Barros de Oliveira, D. (2020).** Plants as sources of anti-inflammatory agents. *Molecules*, 25(16), 3726.
- Orban, J. C. (2011).** Oxygène, stress oxydant. *In Désordres métaboliques et réanimation*, 427-437.
- Orliaguet, G., Gall, O., & Benabess-Lambert, F. (2013).** Nouveautés concernant les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*, 17(5), 228-237.
- Othmen, K. B., Elfalleh, W., Beltrán, J. M. G., Esteban, M. Á., & Haddad, M. (2020).** An *in vitro* study of the effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocyte activities. Antioxidant, cytotoxic and bactericidal properties. *Fish & Shellfish Immunology*, 99, 35-43.
- Ouedraogo, N., Lompo, M., Sawadogo, R. W., Tibiri, A., Hay, A. E., Koudou, J., ... & Guissou, I. P. (2012).** Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des

décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*, 10(5), 286-292.

Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, 41(12), 1727-1738.

Öztürk, M., Seçmen, O., Gücel, S., & Sakcali, S. (2011). An overview of economic and medicinal importance of carob plants (*Ceratonia siliqua* L.) in the Mediterranean basin. In *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants and History of Mayan Ethnopharmacology*, 964, 197-203.

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 1-13.

Rahman, H., Eswaraiah, M. C., & Dutta, A. M. (2015). *In-vitro* anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza Sativa* Var. *joha* rice (an aromatic indigenous rice of Assam). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 15(1), 115-121.

Recio, C. M., Andujar, I., & L Rios, J. (2012). Anti-inflammatory agents from plants : progress and potential. *Current medicinal chemistry*, 19(14), 2088-2103.

Références bibliographiques

Rex, J. R. S., Muthukumar, N. M. S. A., & Selvakumar, P. M. (2018). Phytochemicals as a potential source for anti-microbial, anti-oxidant and wound healing-a review. *MOJ Bioorganic & Organic Chemistry*, 2(2), 61-70.

Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1711-1723.

Roquilly, A., & Asehnoune, K. (2019). Corticoïdes et sepsis. *Anesthésie & Réanimation*, 5(3), 186-192.

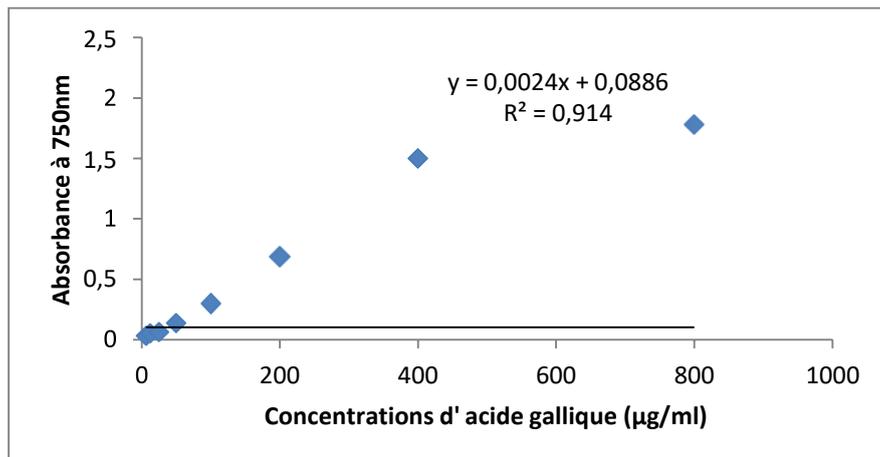
- Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Oliveira, D. L., Roque, R., Bernardo-Gil, M. G., Martins, A. I., ... & Rauter, A. P. (2013). Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products*, 47, 132-138.
- Rtibi, K., Jabri, M. A., Selmi, S., Sebai, H., Amri, M., El-Benna, J., & Marzouki, L. (2016). *Ceratonia siliqua* leaves exert a strong ROS-scavenging effect in human neutrophils, inhibit myeloperoxidase *in vitro* and protect against intestinal fluid and electrolytes secretion in rats. *Royal Society of Chemistry advances*, 6(70), 65483-65493.
- Rtibi, K., Jabri, M. A., Selmi, S., Souli, A., Sebai, H., El-Benna, J., ... & Marzouki, L. (2015). Gastroprotective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) against ethanol-induced oxidative stress in rat. *Bio Med Central complementary and alternative medicine*, 15(1), 1-8.
- Rtibi, K., Selmi, S., Grami, D., Amri, M., Eto, B., El-Benna, J., ... & Marzouki, L. (2017). Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 522-528.
- Rtibi, K., Selmi, S., Jabri, M. A., Mamadou, G., Limas-Nzouzi, N., Sebai, H., ... & Amri, M. (2016). Effects of aqueous extracts from *Ceratonia siliqua* L. pods on small intestinal motility in rats and jejunal permeability in mice. *Royal Society of Chemistry advances*, 6(50), 44345-44353.
- Sánchez, A., Calpena, A. C., & Clares, B. (2015). Evaluating the oxidative stress in inflammation: role of melatonin. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 16981-17004.
- Setty, A. R., & Sigal, L. H. (2005). Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. In *Seminars in arthritis and rheumatism*, 34(6), 773-784.
- Shahwar, D., & Raza, M. A. (2012). Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(7), 547-550.
- Shobana, S., & Vidhya, R. (2016). Evaluation of *in vitro* hemolytic activity of different parts of *Abutilon indicum* (Linn.). *World Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences*, 5(5), 1182-1196.
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(7), 363-383.

- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017).** Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018).** based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Analytical sciences*, 34(7), 795-800.
- Sivaraj, C., Arumugam, P., & Gayathri, K. (2017).** Anti-inflammatory, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Essential Oil Extracted from *Salvia officinalis* L. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(6), 257-263.
- Spizzirri, U. G., Abduvakhidov, A., Caputo, P., Crupi, P., Muraglia, M., Oliviero Rossi, C., ... & Restuccia, D. (2022).** Kefir Enriched with Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Leaves Extract as a New Ingredient during a Gluten-Free Bread-Making Process. *Fermentation*, 8(7), 1-14.
- Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., & Gebre-Mariam, T. (2005).** Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 168-175.
- Tuksitha, L., Chen, Y. L. S., Chen, Y. L., Wong, K. Y., & Peng, C. C. (2018).** Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo (Sarawak). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(2), 563-570.
- Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., & Polat, G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12(3), 484-496.
- Vázquez, C. V., Rojas, M. G. V., Ramírez, C. A., Chávez-Servín, J. L., García-Gasca, T., Martínez, R. A. F., ... & de la Torre Carbot, K. (2015).** Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. *Food Chemistry*, 176, 480-486.
- Weill, B., & Batteux, F. (2003).** *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. De Boeck Supérieur, 12-35.
- Wiart, C. (2006).** *Medicinal plants of Asia and the Pacific*. Wiart C (2006). Eds, Humana Press (Totowa), 1-20.

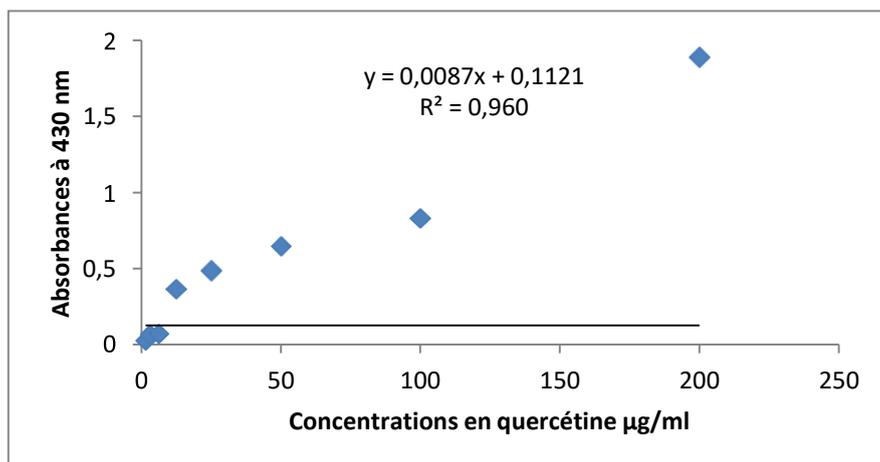
Ydjedd, S., Chaala, M., Richard, G., Kati, D. E., López-Nicolás, R., Fauconnier, M. L., & Louaileche, H. (2017). Assessment of antioxidant potential of phenolic compounds fractions of Algerian *Ceratonia siliqua* L. pods during ripening stages. *International Food Research Journal*, 24(5), 2041-2049.

Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469(7329), 221-225.

Annexes



Annexe 1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux



Annexe 2: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux

Réalisé par : MIMOUN Merieme REZIG Sabrina BEKOUDJ Hassiba	Jury : Présidente : M ^{me} . REZZAGUI Abir Examinatrice : Dr. RYANE Karima Encadrante : Dr. BOUTENNOUN Hanane Date de soutenance : 12/09/2022
Thème Composition phytochimique et activités antioxydante et anti-inflammatoire <i>in vitro</i> des extraits phénoliques de <i>Ceratonia seliqua</i>	
<p style="text-align: center;">Résumé</p> <p>Notre travail vise à faire une étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire <i>in vitro</i> des extraits bruts de deux parties (feuilles et fruit) de <i>Ceratonia seliqua</i>. L'étape d'extraction des polyphénols a été suivie par le dosage des polyphénols et des flavonoïdes. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le test du DPPH et le pouvoir réducteur du Fer. Les tests de la dénaturation de protéines (BSA) et la stabilisation de la membrane des globules rouges ont été choisis pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire. Les dosages phytochimiques ont montré que l'extrait des feuilles est plus riche en polyphénols et flavonoïdes ($141,688 \pm 7,396$ mg EAG/g EB et $48,122 \pm 1,873$ mg EQ/g EB respectivement) par rapport à celui de fruit ($45,597 \pm 2,203$ mg EAG/gEB et $12,46 \pm 2,235$mg EQ/g EB respectivement). L'activité antiradicalaire au DPPH et le pouvoir réducteur du Fer ont révélé que l'extrait méthanolique des feuilles présente l'activité antioxydante la plus élevée par rapport au fruit. Pour l'activité anti-inflammatoire, les résultats ont montrés aussi que l'extrait brut des feuilles présente une activité puissante vis-à-vis de la dénaturation des protéines (BSA), et a un effet protecteur contre l'hémolyse de la membrane des globules rouges important par rapport à l'extrait de fruit qui était moins actif.</p> <p>Mots clés : <i>Ceratonia seliqua</i>, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, polyphénols.</p>	
<p style="text-align: center;">Abstract</p> <p>Our work aims to make a phytochemical study and to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities <i>in vitro</i> of the crude extracts of two parts (leaves and fruit) of <i>Ceratonia seliqua</i>. The polyphenols extraction step was followed by the determination of polyphenol and flavonoid contents. The antioxidant activity was evaluated using the DPPH test and the ferric reducing power. Protein denaturation (BSA) and red blood cell membrane stabilization assays were chosen for the anti-inflammatory activity. Phytochemical assays showed that leaves extract is richer in polyphenols and flavonoids (141.688 ± 7.396 mg EAG/g EB and 48.122 ± 1.873 mg EQ/g EB respectively) compared to fruit (45.597 ± 2.203 mg EAG/gEB and 12.46 ± 2.235mg EQ/g EB respectively). The DPPH antiradical activity and the ferric reducing power reveal that the methanol extract of the leaves has the highest antioxidant activity compared to the fruit. For the anti-inflammatory activity, the results also showed that the crude extract of the leaves has a powerful activity against denaturation of proteins (BSA), and has an important protective effect against membrane hemolysis of red blood cells important compared to fruit extract, which is less active.</p> <p>Key words: <i>Ceratonia seliqua</i>, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, polyphenols.</p>	
<p style="text-align: center;">المخلص</p> <p>يهدف عملنا إلى إجراء دراسة فيتوكيميائية وتقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للالتهابات في المختبر من المستخلصات الخام من جزأين (الأوراق والفاكهة) من <i>Ceratonia seliqua</i>. أتبعنا خطوة استخلاص البوليفينول بتقدير البوليفينول والفلافونويد. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام اختبار DPPH والقوة الاختزالية للحديد. تم اختيار تخريب البروتين (BSA) وتنشيط غشاء خلايا الدم الحمراء لدراسة النشاط المضاد للالتهابات. أظهرت الاختبارات الفيتوكيميائية أن مستخلص الأوراق أكثر ثراءً بالبوليفينول والفلافونويد ($141,688 \pm 7,396$ mg EAG/g EB و $48,122 \pm 1,873$ mg EQ/g EB على التوالي) مقارنة بالفواكه ($45,597 \pm 2,203$ mg EAG/gEB و $12,46 \pm 2,235$ mg EQ/g EB على التوالي). يكشف النشاط المضاد للجدر في DPPH والقوة الاختزالية للحديد أن مستخلص ميثانول الأوراق له أعلى نشاط مضاد للأكسدة مقارنة بالفاكهة. بالنسبة للنشاط المضاد للالتهابات، أظهرت النتائج أيضاً أن المستخلص الخام للأوراق له نشاط قوي مقابل تخريب البروتينات (BSA)، وله تأثير وقائي مهم ضد انحلال غشاء خلايا الدم الحمراء مقارنة بمستخلص الفاكهة الأقل نشاطاً.</p> <p style="text-align: center;">الكلمات المفتاحية : <i>Ceratonia seliqua</i> ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للالتهابات ، بوليفينول.</p>	