

UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département d'Agroalimentaire

MEMOIRE DE MAGISTER

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et Transformation des Aliments

**EXTRACTION ET CARACTERISATION DE LA FRACTION
LIPIDIQUE DE LA CAROUBE « *Ceratonia siliqua* L » ET ETUDE DES
ACTIVITES BIOLOGIQUES**

Par

Wafae KABIR

Devant le jury composé de :

L. SAADI	MCA., U. S. D. Blida 1	Présidente
D. ELHADI	MCA., U. S. D. Blida 1	Examineur
A. DOUMANDJI	MCA., U. S. D. Blida 1	Examinatrice
H. MOKRANE	MCA., E. N. S. Kouba	Examinatrice
M. KHALI	MCA., U. S. D. Blida 1	Rapporteur

RESUME

Le caroubier « *Ceratonia siliqua* L » caractéristique des régions méditerranéennes, est un arbre cultivé pour ses fruits et qui suscite d'énormes intérêts socioéconomiques.

Le présent travail, vise à étudier la composition biochimique de la caroube récoltée de la région de Soumaa (Blida), ainsi qu'une extraction de la fraction lipidique de pulpe et graines en vue d'une caractérisation physicochimique, de la détermination du profil en acides gras, et l'étude de ses activités biologiques.

Les résultats montrent que la pulpe et les graines sont caractérisées respectivement par des teneurs en eau 9,1% et 6,26%, matière minérale 3,33% et 4,64%, matière azotée totale 7,88% et 19,25%, sucres totaux 51,57% et 30,39%, matière grasse 1,03% et 1,82%, et enfin fibres insolubles 29,82% et 15,34% avec des différences hautement significatives.

Les acides gras majoritaires détectés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGSM) sont l'acide myristique 8.40%, caprique 8.04%, oléique 15.92% et linoléique 43.09%, pour l'huile de pulpe. Celle des graines est composée essentiellement d'acide linoléique 45.61%, oléique 40.58% et myristique 10.43%. Par ailleurs, les caractéristiques physicochimiques de ces fractions des graines et pulpe sont respectivement : indice de réfraction 1.472 et 1.446, densité relative 0.86 et 0.81, indice d'acide 0.69 et 0.51, indice de saponification 169.14 et 177.09, indice d'ester 168.45 et 176.58.

Les résultats de l'étude de l'activité antioxydante *in vitro* montrent que l'huile de pulpe a une IC₅₀ proche à celle des graines (10.9 et 12.83 respectivement)

D'autre part, l'huile de pulpe semble avoir un effet inhibiteur de la croissance de toutes les souches microbiennes utilisées. Par contre l'huile des graines a un effet antifongique seulement, et cela vis-à-vis *Candida albicans*.

Mots clés : Caroube *Ceratonia siliqua* L, composition biochimique, fraction lipidique, CGMS, activités biologiques.

ABSTRACT

Carob tree "*Ceratonia siliqua* L.", is one of the characteristic vegetation of the Mediterranean area which has socioeconomic importance. It has been widely cultivated especially for its fruits.

The aim of the current study was to evaluate the biochemical composition of carob (seeds and pulp). Then, the lipid extract was analyzed chromatographically and evaluate the physicochemical characteristics and biological activities.

Pulp and seeds of carob are characterized respectively by: moisture 9.1%±0.18 and 6.26%, ash 3.33% and 4.64%, proteins 7.88% and 19.25%, sugar 51.57% and 30.39%, lipids 1.03% and 1.82%, and finally insoluble fiber 29.82% and 15.34%. The difference has been widely significant.

The GCMS analyze indicate that the oil on pulp is composed of myristic acid 8.40%, capric acid 8.04%, oleic acid 15.92% linoleic acid 43.09%. The other oil (of seeds) contains linoleic acid 45.61, oleic acid 40.58% and myristic acid 10.43%.

The physicochemical characteristics of these oils (seeds and pulp) are respectively: refraction index 1.472 and 1.446, density 0.86 and 0.81, acid index 0.69 and 0.51, saponification index 169.14 and 177.09, ester index 168.45 and 176.58.

The results of antioxidant activity indicate that both of seed and pulp oil have comparable IC₅₀ which are respectively 12.83 and 10.91.

On the other hand, pulp oil seems have antibacterial and antifungal activity on all microorganisms used. The other oil has only an antifungal effect on the growth of *Candida albicans*.

Keywords: carob *Ceratonia siliqua* L, biochemical composition, lipidic fraction, GCMS, antioxidant and antimicrobial activities.

ملخص

الخروب « *Ceratonia siliqua L* » من الأشجار المميزة لمناطق البحر الابيض المتوسط ذو اهمية اجتماعية و اقتصادية. تغرس هذه الشجرة من أجل ثمارها.

هذه الدراسة تهدف الى تبيان و تحديد التركيبة البيو كيميائية لخروب من منطقة الصومعة بولاية البليدة و استخراج المادة الدهنية من اللب و البذور من اجل تحليلها فيزيوكيميائيا , تحديد الاحماض الدهنية و دراسة خصائصها البيولوجية.

النتائج اظهرت ان اللب و البذور يحتويان على التوالي : $9.1\% \pm$ و 6.26% من الماء, 3.33% و 4.64% مادة معدنية, 7.88% و 19.25% من البروتينات, 51.57% و 30.39% سكريات , 1.03% و 1.82% مادة دهنية , و اخيرا الالياف الغير القابلة للذوبان 29.82% و 15.34% و ذلك مع فرق كبير للغاية.

تم الكشف عن الاحماض الدهنية عن طريق الكروماتوغرافيا الغازية المقرونة بالطيف الكمي CGMS حيث بينت ان اغلب الاحماض الموجودة في زيت اللب هي حمض الميريستيك 8.40% , الكابريك 8.04% , الاوليك 15.92% و اللينوليك 43.09% , اما بالنسبة لزيت البذور فنجد حمض اللينوليك 45.61% , حمض الاوليك 40.58% , و 10.43% من حمض الميريستيك . الخصائص الفيزيوكيميائية لزيت البذور و اللب هي على التوالي معامل الانكسار 1.472 و 1.446 , الكثافة 0.86 و 0.81 , معامل الحموضة 0.69 و 0.51 , معامل التصبن 169.14 و 177.09 , معامل الاسترة 168.45 و 176.58 .

نتائج دراسة النشاط المضاد للأكسدة تبين ان زيتا اللب و البذور تملكان IC_{50} متقاربتين (10.91 و 12.83 على التوالي).

من جهة اخرى زيت اللب له تأثير على نمو جميع الميكروبات التي استعملناها, اما زيت البذور فله تاثير مضاد للفطريات فقط و هذا ضد *Candida albicans*

الكلمات الجوهرية:

الخروب « *Ceratonia siliqua L* » , التركيبة البيوكيميائية, المادة الدهنية, CGMS , النشاط المضاد للأكسدة, النشاط المضاد للمكروبات

REMERCIEMENTS

Comme je le fais, et je le ferai toujours, je remercie, incessamment, le bon Dieu qui m'a accordé courage, patience et volonté pour pouvoir verser cette goutte dans l'océan de la science.

Je veux exprimer ici ma vive reconnaissance à Mr. KHALI M, MCA à l'université de Blida 1, pour son encadrement sans faille, dévouement incomparable et pour la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien ce projet. Je tiens également à le remercier pour tout le soutien scientifique et moral qu'il m'a apporté tout au long de ce travail mais également pour sa disponibilité, ses précieux conseils qu'il continue à me donner encore aujourd'hui.

Mes plus vifs remerciements vont aussi à tous les membres de jury pour leurs efforts, leur contribution et leurs commentaires précieux dans l'amélioration de mon mémoire, plus particulièrement à :

- Mlle SAADI L, MCA à l'université Blida 1, d'avoir accepté d'être présidente de mon jury.

- Mr EL HADI D ; MCA à l'université Blida 1, Mme DOUMANDJI A ; MCA à l'université Blida 1 et Mme MOKRANE H ; MCA à l'ENS de Kouba, qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail et de me faire ainsi bénéficier de leurs compétences et de leurs connaissances.

Je remercie également Professeur LAFRI M, directeur de l'institut des sciences vétérinaires pour m'avoir accordée sa confiance pour la réalisation de ce travail au sein de son laboratoire de recherche des biotechnologies liées à la reproduction animale à l'institut des sciences vétérinaires, université Blida 1.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance au Professeur KAIDI R, pour sa rigueur scientifique, ses conseils et sa très grande sympathie qui ont contribué à une bonne entente.

Merci aussi à Monsieur Djazouli Z.E précisément pour sa précieuse aide en statistiques.

Mes sincères remerciements s'adressent à Monsieur RAMDHAN Sidali. Merci énormément.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance aux personnes qui m'ont apportée des appuis scientifiques, qu'il s'agisse de conseils ou d'informations. Je pense notamment à tous les responsables des laboratoires à l'université Blida 1 sans oublier :

- Monsieur BEN CHERCHALI, responsable du laboratoire de Zootechnie ainsi que son ingénieur de laboratoire Mme Zemmouli S.

- Mme BOUMAAD N ingénieur du laboratoire de PFE, et Mlle FATIHA., ingénieur du laboratoire des matériaux, département de chimie industrielle.

- Tous les ingénieurs des laboratoires de la faculté des sciences de la nature et de la vie surtout Fettouma, Hadjer, Chafika, Hayat et Selma.

- Djeghboub S, ingénieure du laboratoire de microbiologie, institut des sciences vétérinaires.

- Tous les ingénieurs des laboratoires de l'ISV, notamment Mme Bentoura S et Mme Ammour S.

Mille mercis aux ingénieurs de laboratoires de l'URD, Entreprise de Rénovation du Matériels aéronautiques, Dar El Beidha, Alger.

Un grand merci également aux gérants et fournisseurs du Diagnolab, Gué de Constantine, Alger.

Une grande pensée va également à toutes les personnes qui m'ont aidée dans le cadre de la réalisation de ce mémoire surtout : Ghaliaoui Noura, Khelouia Lamia, Neche Leila, Chentir Imène, Belkebir Amina Aiza Asma et Sellali Sabrina.

Un clin d'œil à ma très chère mère qui n'est plus là et qui aurait été fière de moi. C'est grâce à vous que je suis là. Je ne vous oublierai jamais maman.

Et la famille, la dernière citée mais celle qui a le plus de place dans mon cœur. Je sais que ce mémoire est un peu le vôtre et que sans vous, il ne serait pas terminé. Je vous remercie pour votre patience, soutien, et pour votre compréhension. Merci cher papa, merci chers sœurs Fatima et Hadjer Merci mes frères, Youcef, Abdelhak et Mohamed. Un grand merci pour tata Karima et ma cousine Louiza.

J'aimerais exprimer ma gratitude à mes très chères collègues Imène et Nadia.

Merci enfin à tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin dans ce projet.

Et à tous ceux que j'aurais oubliés bien involontairement, merci.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION.....18

CHAPITRE 1 : LE CAROUBIER ET LA CAROUBE

1.1. Origine :.....	20
1.2. Taxonomie :	20
1.3. Noms communs :	20
1.4. Description botanique :.....	20
1.4.1. Feuilles:.....	21
1.4.2. Fleurs :.....	21
1.4.3. Fruits :.....	22
1.4.4. Système racinaire :	23
1.5. Reproduction biologique :.....	24
1.6. Répartition géographique :.....	25
1.6.1. Dans le monde :	25
1.6.2. En Algérie :.....	26
1.7. Aire de production :.....	27
1.8. Propriétés et utilisation :.....	28
1.8.1. Arbre :.....	28
1.8.2. Autres parties :.....	28
1.9. Production mondiale de la caroube.....	29
1.10. Composition chimique de la caroube :.....	29
1.10.1. Pulpe :.....	30
1.10.1.1. Sucres totaux :.....	31
1.10.1.2. Fibres :.....	31
1.10.1.3. Lipides :.....	31
1.10.1.4. Minéraux :.....	31
1.10.1.5. Vitamines :.....	32

1.10.2. Graine :.....	33
1.11. Intérêts et utilisation de la caroube :.....	35
2.3.1. Pulpe :.....	35
2.3.2. Graine :.....	36

CHAPITRE 2 : LIPIDES ET HUILES VEGETALES

2.1. Les lipides :.....	38
2.1.1. Définition des acides gras :.....	38
2.1.2. Les acides gras saturés :.....	39
2.1.3. Les acides gras insaturés :.....	39
2.1.3.1. Les acides gras monoinsaturés.....	39
2.1.3.2. Les acides gras polyinsaturés :.....	39
2.1.3.3. Nomenclature officielle :.....	40
2.1.3.4. Nomenclature oméga :.....	40
2.1.4. Les vitamines et les lipides :.....	41
2.1.5. Besoins nutritionnels en lipides :.....	41
2.2. Les huiles végétales :.....	42
2.2.1. Types des huiles :.....	42
2.2.2. Composition des huiles végétales :.....	42
2.2.2.1. La fraction saponifiable :.....	42
2.2.2.1.1. Triacylglycérols :.....	43
2.2.2.1.2. Mono et diacylglycérols :.....	43
2.2.2.1.3. Phospholipides :.....	43
2.2.2.1.4. Cérides :.....	43
2.2.2.1.5. Stérides :.....	43
2.2.2.2. La fraction insaponifiable :.....	43
2.2.2.2.1. Pigments :.....	44
2.2.2.2.2. Composés volatiles et aromatiques :.....	44
2.2.2.2.3. Protéines :.....	44
2.2.2.2.4. Tocophérol :.....	44
2.2.3. Caractéristiques des huiles végétales :.....	45

CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES

3.1. Matériel :.....	46
----------------------	----

3.1.1. Matériel biologique :.....	46
3.1.1.1. Matériel végétal :.....	46
3.1.1.2. Microorganismes :.....	46
3.1.2. Matériel non biologique :.....	47
3.2. Méthodes :.....	47
3.2.1. Identification de l'espèce :.....	47
3.2.2. Préparation du matériel végétal :.....	47
3.2.3. Détermination de la composition chimique de la caroube:.....	49
3.2.3.1. Pulpe :.....	49
3.2.3.1.1. Détermination de la teneur en eau:.....	49
3.2.3.1.2. Détermination de la teneur en cendres :.....	50
3.2.3.1.3. Dosage des protéines brutes :.....	50
3.2.3.1.4. Dosage des sucres totaux :.....	53
3.2.3.1.5. Fractionnement et dosage des polyosides pariétaux :.....	54
3.2.3.1.6. Dosage et extraction de la matière grasse :.....	56
3.2.3.2. Graines :.....	58
3.2.4. Analyse des huiles végétales (de pulpe et des graines):.....	58
3.2.4.1. Caractérisation par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse « CG/SM » :.....	58
3.2.4.1.1. La transesterification :.....	59
3.2.4.1.2. Chromatographie en phase gazeuse :.....	59
3.2.4.1.3. Spectrométrie de masse (SM):.....	60
3.2.4.1.4. Couplage chromatographe gazeuse/spectrométrie de masse :.....	60
3.2.4.2. Caractéristiques physicochimiques des deux huiles :.....	62

3.2.4.2.1. Détermination de l'aspect et la couleur à 20°C pendant 24 heures:.....	62
3.2.4.2.2. La densité relative :.....	62
3.2.4.2.3. L'indice de réfraction :.....	62
3.2.4.2.4. Indice d'acide :.....	63
3.2.4.2.5. Indice de saponification :.....	64
3.2.4.2.6. L'indice d'ester :.....	65
3.2.4.3. Etude des activités biologiques des huiles végétales :.....	65
3.2.4.3.1. Etude de l'activité antioxydante « test <i>in vitro</i> » :	65
3.2.4.3.2. Etude de l'activité antimicrobienne « étude <i>in vitro</i> »:.....	67
3.2.4.3.2.1. L'aromatogramme : (test qualitatif).....	67
3.2.4.3.2.2. Techniques à base de dilutions : (test quantitatif).....	70
3.2.4.3.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI » (test quantitatif) :.....	71
3.2.4.3.2.4. Test de contrôle :	71
3.2.5. Analyse statistique:.....	71

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Résultats de la détermination de la composition chimique de <i>C. siliqua</i> L :.....	72
4.1.1. Teneur en eau :.....	72
4.1.2. Teneur en cendres :	73
4.1.3. Dosage des protéines brutes :	75
4.1.4. Dosage des sucres totaux :.....	77
4.1.5. Fractionnement et dosage des polysides pariétaux :.....	78
4.1.6. Teneurs en matière grasse :.....	80
4.2. Analyse des huiles de caroube par CG/SM :.....	82
4.3. Caractérisation physicochimique des huiles :.....	87
4.3.1. Détermination de l'aspect et la couleur à 20°C pendant 24 heures :...	87
4.3.2. Caractéristiques physicochimiques des huiles de caroube:.....	88

4.4. Activités biologiques :.....	88
4.4.1. Résultats de l'activité antioxydante :.....	88
4.4.2. Activité antimicrobienne « test <i>in vitro</i> »:.....	93
4.4.2.1. Antibiogramme :.....	93
4.4.2.2. Aromatogramme :.....	96
4.4.2.3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI):.....	101
COCLUSION ET PERSPECTIVES.....	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105
APPENDICES	124

LISTE DES FIGURES

Figure 1. 1: L'arbre du caroubier <i>Ceratonia siliqua</i> L. (Originale 2014).....	21
Figure 1. 2 : Les gousses de caroube (Originale 2014).....	23
Figure 1. 3: Les graines de caroube (Originale 2014).....	23
Figure 1. 4 : Centre d'origine et distribution du caroubier dans le monde.	26
Figure 1. 5: Répartition du caroubier en Algérie suivant les domaines bioclimatiques.....	27
Figure 1. 6: Composition d'une graine de caroube (Originale).....	34
Figure 1.7: La gomme de caroube.....	35
Figure 2.1: Structure générale d'un acide gras.....	38
Figure 3. 1: (A) gousses de caroube et farine de la pulpe. (B) graines et farine des graines de caroube.....	46
Figure 3. 2 : Schéma général de l'étude expérimentale (Original).....	48
Figure 3.3 : Appareil à soxhlet (Originale 2014).....	58
Figure 3.4 : la forme libre et réduite du DPPH.....	66
Figure 3.5 : Illustration de la technique d'aromatogramme utilisée (Original 2014).....	69
Figure 4. 1 : Teneur en eau de la pulpe et des graines de caroube.....	72
Figure 4. 2 : Teneur en cendre de la pulpe et des graines de caroube.....	74
Figure 4. 3: Teneur en protéines brutes de la pulpe et des graines de caroube.....	75
Figure 4. 4: Teneurs en sucres totaux des pulpe et graines.....	77
Figure 4. 5 : Les différents constituants de la paroi végétale des graines et pulpe de la caroube.....	79

Figure 4. 6: Taux de matière grasse des graines et pulpe.....	81
Figure 4. 7 : Chromatogramme de l'huile des graines de caroube.....	82
Figure 4. 8 : Chromatogramme de l'huile de pulpe de caroube.....	83
Figure4. 9 : Le total des acides gras saturés et insaturés des huiles de graines et de pulpe.....	86
Figure 4. 10 : A droite : huile de pulpe. A gauche : huile des graines.....	87
Figure4.11 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en vitamine E.....	89
Figure 4.12 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en HVg.	90
Figure 4.13 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en HVp.....	90
Figure 4.14 : (A) : IC ₅₀ des différents extraits. (B) :pouvoir antiradicalaire.....	91
Figure 4.15 : Antibiogramme des souches testées.....	94
Figure 4.16 : Diamètres moyens des ZI des ATB standards vis-à-vis chaque souche.....	95
Figure 4.17 :Aromatogramme de l'HVg.....	96
Figure 4.18 : Aromatogramme de l'HVp.....	97
Figure4.19 : Histogramme comparatif de l'effet antimicrobien des deux extraits et ATB.....	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Superficie occupée par le caroubier.....	27
Tableau 1.2 : Production mondiale de la caroube.....	29
Tableau 1.3 : La composition chimique de la pulpe.....	30
Tableau 1.4 : Valeurs moyennes des minéraux de la pulpe.....	32
Tableau 1.5 : Teneur en vitamine de la pulpe.....	33
Tableau 3.1 : code de référence des souches microbiennes.....	47
Tableau 3.2 : Composition des détergents (2 litres).....	55
Tableau 3.3 : Conditions opératoires pour la CG/MS.....	61
Tableau 3.4 : Transcription des diamètres des zones d'inhibition.	69
Tableau 4.1: Profil et composition en acides gras des huiles de graines et de pulpe de caroube.....	84
Tableau 4.2 : Aspect et couleur des huiles.....	87
Tableau 4.3 : Caractéristiques physicochimiques des huiles de caroube....	88
Tableau 4.4 : Résultats de l'antibiogramme (diamètres moyens des zones d'inhibitions \pm écarts types en mm).....	94
Tableau 4.5 : Diamètres des zones d'inhibition provoquées par l'HVg et degré de sensibilité des souches.....	98
Tableau 4.6 : Diamètres des zones d'inhibition provoquées par l'HVp et degré de sensibilité des souches.....	98
Tableau 4.7 : les CMI de chaque extrait en %.....	101

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

MS : matière sèche.

mg : milligramme.

Kg : kilogramme.

µg : microgramme.

g : gramme.

AGS : acide gras saturé.

AGI : acide gras insaturé.

AGPI : acide gras polyinsaturé.

AGMI : acide gras monoinsaturé.

LDL: Low Density Lipoprotein.

HDL: High Density Lipoprotein.

ATCC : American Type Culture Collection.

µm : micromètre.

°C : degré Celsius.

H% : pourcentage d'humidité.

MO : matière organique.

%C : pourcentage des cendres.

H₂SO₄ : acide sulfurique.

ml : millilitre.

N : normalité.

M : molarité.

NaOH : hydroxyde de sodium.

%N : pourcentage d'azote total.

h : heure.

nm : nanomètre.

DO : la densité optique.

NDF : neutral detergent fiber.

ADF : acid detergent fiber.

CTAB : cétyle triméthyle ammonium bromide.

ADL: acid detergent lignin.

L: litre.

EDTA: disodium ethylene diamine tetra acetate dehydrate.

CPG : chromatographie en phase gazeuse.

IE : impacte électronique.

IC : impacte chimique.

SM : spectrométrie de masse.

CPG/SM (CGMS): couplage chromatographie en phase gazeuse- spectrométrie de masse.

Ev : électronvolt.

HCl : acide chlorhydrique.

µl : microlitre.

D : densité relative.

I_A : indice d'acide.

I_S : indice de saponification.

I_E : indice d'ester.

V : volume.

DPPH : di-phényl-picryl-hydrazine.

HV : huile végétale.

HV_p : huile végétale de la pulpe.

HV_g : huile végétale des graines.

IC₅₀ (EC₅₀) : la concentration inhibant 50% du DPPH.

MH : Muller Hinton.

DM : dilution mère.

OMS : organisation mondiale de la santé.

FAO: food and agricultur organization.

ZI: zone d'inhibition.

ATB: antibiotique.

PI: acide pipémidique.

CHL: chloramphenicol.

AF: acide fucidique.

CMI: concentration minimale inhibitrice

INTRODUCTION

Le caroubier est un arbre caractéristique apprécié depuis des milliers d'années par les habitants des pays méditerranéens, puisque considéré comme étant l'un des arbres fruitiers et forestiers qui présente le plus grand potentiel de valorisation [1].

Le caroubier ou *Ceratonia siliqua* L, est une espèce agro-sylvo-pastorale qui présente d'énormes intérêts socioéconomique et écologique [1] dont toutes ses composantes (feuilles, fleurs, bois, écorce, racine et fruits) sont exploitées [2].

C'est une essence qui a été cultivée depuis l'ère néolithique ayant en outre un intérêt de plus en plus grandissant en raison non seulement de sa rusticité, de son indifférence vis-à-vis du sol, de son bois de qualité, sa valeur ornementale et paysagère, mais surtout pour ces fruits ; la caroube. Ces derniers font l'objet de nombreuses transactions commerciales [1].

La caroube, étant une gousse composée d'une pulpe sucrée (90%) englobant des graines (10%) [3], présente des propriétés assez importantes leurs conférant l'aptitude à être utilisée dans plusieurs domaines (agroalimentaire, chimie, pharmacie, alimentation du bétail,... [4-9].

De nos jours, la caroube est principalement exploitée pour la production de la gomme ; Sin410 provenant de l'endosperme de ses graines [2]. C'est un additif d'autant utilisé dans l'alimentation humaine, confiserie, domaine cosmétique et pharmaceutique comme agent épaississant, stabilisant, gélifiant et liant [1, 10].

Pendant le processus d'extraction de la gomme, des sous-produits sont obtenus : la pulpe et la farine du germe. Cette dernière très riche en protéines (jusqu'à 50%) est principalement utilisée dans la formulation d'aliments infantiles [11]. D'une autre part, dépourvue de caféine et théobromine et sa saveur sucrée, la pulpe est utilisée en industrie agroalimentaire soit un remplaçant idéal du cacao. Actuellement, elle est utilisée principalement pour l'alimentation du bétail [11]. Afin de déterminer sa composition, plusieurs études ont été menées [3, 12, 13, 14]. Cette pulpe est très riche en sucre (de 40% à 60%) en particulier saccharose, fructose et glucose, ce qui lui vaut sa saveur sucrée. C'est pour cette raison qu'elle est utilisée

pour la production d'un sirop appelé mélasse [15]. Elle constitue aussi une alternative pour la production du saccharose étant plus riche en sucre que la canne à sucre et la betterave sucrière.

Elle présente également une teneur assez importante en fibre (de 4.2 à 39.8%) [11, 16, 17]. Une étude a été réalisée sur cette fraction fibre de la caroube a montré que celle-ci pourrait réduire le taux de cholestérol sanguin [18, 19].

De même, plusieurs travaux ont été effectués afin de déterminer sa composition en acides aminés, les minéraux et les vitamines [14, 20, 21].

Sa richesse en composés phénoliques est à l'origine de ses remarquables propriétés antioxydantes [22, 23].

Par ailleurs, la fraction lipidique que ce soit de la pulpe ou des graines, même à des teneurs très faibles par rapport aux autres constituants, reste faiblement étudiée et caractérisée, et très peu d'informations sont disponibles. Ainsi, la caractérisation de ces lipides (huile végétale) en termes de composition et leurs rôles biologiques sont intéressants à déterminer.

C'est dans cette optique que s'articule notre travail qui présente deux principaux volets. D'une part, une étude de la composition chimique des deux composantes de la caroube (pulpe et graines) a été menée. D'une autre part, nous avons extrait l'huile végétale de ces deux matrices afin de les caractériser sur le plan physicochimique, ainsi que la détermination de leurs rôles biologiques.

CHAPITRE 1 : LE CAROUBIER ET LA CAROUBE

1.1. Origine :

Le caroubier est domestiqué depuis le néolithique 4000 ans avant J.C [24], et sa culture extensive date au moins de 200 ans avant J.C [25].

Ses origines ne sont pas précises. Pour certains auteurs, elles semblent être de l'Est de la méditerranée (Turquie et Syrie) [2, 4, 26, 27, 28]. Par contre, Schweinfurth a insinué qu'il est originaire des pays montagneux du Sud d'Arabie (Yémen) [29, 30]. Tardivement, il a été considéré par Zohary comme originaire de la flore d'Indo-Malaisie, groupé avec l'olivier, le laurier et d'autres plantes [31].

1.2. Taxonomie :

Scientifiquement, le caroubier est appelé *Ceratonia siliqua* L. [32] dérive du grec Keras qui veut dire corne et du latin siliqua désignant une silique ou gousse et faisant allusion à l'extrême dureté des graines et à la forme du fruit [2, 4]

Cette espèce appartient au genre *Ceratonia* qui possède un nombre total de chromosome $2n = 24$ [33, 34], de la sous-famille des *Caesalpinioideae*, de la famille des *Fabaceae* (Légumineuses), qui fait partie de l'ordre des *Fabales* (Rosales), Classe des *Magnoliopsida* [35].

1.3. Noms communs :

Le nom dialectal *kharouv*, originaire de l'hébreu, a donné lieu à plusieurs dérivés tels que *Kharroub* en arabe, *algarrobo* en espagnol, *carrubo* en italien, *caroubier* en français, [35] *Karubenbaum* en Allemand, *alfarrobeira* en Portugais, *charaoupi* en Greque, *charnup* en Turque [4].

Il est aussi appelé Carouge, Pain de saint Jean-Baptiste, figuier d'Egypte, fève de Pythagore [2, 4].

1.4. Description botanique :

Le caroubier est un arbre ou arbuste sclérophylle sempervirent, qui peut atteindre 12 à 15 m de hauteur [36] et parfois jusqu'à 20m [37] avec une circonférence à la base du tronc de 2 à 3 m. Il a une écorce lisse et grise lorsque la plante est jeune, brune et rugueuse à l'âge adulte. Son bois de couleur rougeâtre

est très dur (Figure 1.1). Sa longévité est considérable, dépassant souvent les 200 ans [1, 4, 38, 39, 40].



Figure 1.1: L'arbre du caroubier *Ceratonia siliqua* L. (Photo originale)

1.4.1. Feuilles:

Les feuilles de cet arbre, de 10 à 20 cm de longueur, sont persistantes, coriaces et caractérisées par un pétiole sillonné sur la face interne et un rachis portant 8 à 15 folioles, opposées, de 3 à 7 cm de longueur, avec ou sans foliole terminale, de forme ovale ou elliptique, de couleur vert luisant sur la face dorsale et vert pâle sur la face ventrale [1, 4, 38, 41, 42]. Le caroubier ne perd pas ses feuilles en automne sauf en juillet chaque deux ans, lesquelles sont renouvelées au printemps de la même année, en avril et mai [1, 4].

1.4.2. Fleurs :

Le caroubier est une espèce dioïque [1, 43] dont les fleurs sont regroupées en grappes latérales, habituellement dressées ou ascendantes, brièvement pédonculées [1]. Elles sont initialement bisexuelles puis deviennent habituellement unisexuées au cours du développement floral [4, 44, 45] et l'une des fonctions sexuelles mâle ou femelle est supprimée [46]. Par conséquent le semis donne des

plants avec un ratio de 50% de femelles et 50% des mâles improductifs [1]. Ce rapport est modifié par greffage et bouturage [47] et il existe quelques formes hermaphrodites [25, 48, 49, 50, 51].

Selon **Ait Chitt et al.** [1], la morphologie florale est complexe et varie largement d'une référence à une autre, par exemple il existe des:

- Inflorescences mâles à fleurs caractérisées par des étamines à longs filaments et à pistil non développé.
- Inflorescences mâles à fleurs caractérisées par des étamines courtes et un pistil non développé.
- Inflorescences hermaphrodites à fleurs avec des étamines et un pistil bien développés.
- Inflorescences femelles avec un pistil bien développé et des étamines rudimentaires.
- Inflorescences polygames comportant des fleurs femelles, des fleurs mâles et des fleurs hermaphrodites.

1.4.3. Fruits :

Le fruit du caroubier, appelé caroube ou carouge, est une gousse indéhiscente à bords irréguliers, de forme allongée, rectiligne ou courbée et groupée en grappes. Il est de grande taille, 10 à 20 cm de longueur, 1,5 à 3 cm de largeur et de 1 à 2,5 cm d'épaisseur [1, 4, 41, 52]. Il se développe très lentement nécessitant 9 à 10 mois pour atteindre la maturité. Il est vert puis brun, et, au moment de la maturité, brun foncé à noir. Il est sinueux sur les bords, aplati et présente un tissu pulpeux, sucré, rafraîchissant renfermant des graines [1, 41]. (Figure 1.2).



Figure 1.2 : Les gousses de caroube (Originale 2014).

Chaque gousse contient de 12 à 16 graines soit 10 à 20 % du poids de la gousse en fonction de cultivar et du climat [41, 53, 54, 55]. Ces graines sont ovoïdes, rigides, d'une couleur qui dépend la variété, elles peuvent être marron, rougeâtre, ou noir dont la longueur et la largeur sont respectivement de 8 à 10 mm et de 7 à 8 mm [4]. (Figure 1. 3).



Figure 1.3: Les graines de caroube (Originale 2014).

1.4.4. Système racinaire :

Cet arbre développe un système racinaire pivotant, qui peut atteindre 18m de profondeur [26, 56].

1.5. Reproduction biologique :

De nombreux aspects liés à la reproduction biologique du caroubier, telles que la floraison, la pollinisation, la compatibilité entre les différents sexes ou encore entre les cultivars, ainsi que la fructification, restent largement inconnus [4].

La floraison du caroubier apparaît sur le bois de deux ans et les vieux bois [1, 4].

Il est considéré comme le seul arbre méditerranéen qui fleurisse en été : d'août à octobre [56] ou en automne, de septembre à novembre [4, 57].

Les fleurs mâles apparaissent d'août à septembre et la durée d'émission du pollen semble dépasser celle de la réceptivité des stigmates. Certains ont observé des anthères mûres de juillet à décembre. Cette période de floraison dépend surtout des conditions climatiques, car dans certaines régions chaudes, la floraison peut avoir lieu même au mois de juin [1].

La fleur femelle apparaît à partir de juillet et est adaptée à une pollinisation aussi bien anémophile qu'entomophile [38, 51, 58, 95].

Les fleurs sécrètent des substances nectarifères dont la quantité et la contenance en sucre sont élevées dans la fleur femelle par rapport à son homologue mâle [58].

Les inflorescences productives (femelles et hermaphrodites) portent plusieurs fleurs, mais seul un faible pourcentage porte plus de deux fruits [1].

La croissance de la caroube (fruit) n'est pas rapide, elle passe par trois stades de développement suivant une courbe de croissance, comme la plupart des espèces fruitières. Ainsi ces stades sont bien distingués [1].

- Le premier stade correspond à une croissance lente en automne et en hiver durant lequel la gousse montre une légère augmentation du poids.
- Le deuxième stade correspond à une croissance rapide entre avril et août caractérisé par une période d'activité de la gousse en début printemps.
- Au troisième stade la gousse s'accroît lentement, mûrit et se durcit en juin, change de la couleur verte en brun. Ainsi, la gousse devient mûre après dix mois.

Le caroubier est un arbre alternant (Une année de forte production succède une année de récolte faible ou nulle, c'est un phénomène naturel mais il peut se produire à la suite d'accidents physiologiques).

Cette alternance est contrôlée génétiquement, mais elle peut être accentuée par des facteurs climatiques et de stress ou des pratiques culturelles inadéquates.

1.6. Répartition géographique :

Le caroubier, dont l'aire de répartition s'étend dans les secteurs des plateaux et en moyennes montagnes jusqu'à 1700 m d'altitude, est indifférent à la nature du substrat. Il tolère les sols pauvres, sableux, limoneux lourds, rocailleux et calcaires, schisteux, gréseux et des pH de 6,2 jusqu'à 8,6, mais il craint les sols acides et très humides [5, 60, 61]. Il fait preuve de qualités d'adaptation en terrains et se développe mieux dans les creux et les vallées abritées avec un sol profond et modérément asséchées [62].

Ceratonia siliqua L a été cultivé depuis longtemps pour ses produits dérivés mais aussi pour sa résistance au manque d'eau. C'est une espèce agrosylvopastorale qui peut être utilisée pour la réhabilitation des sols dégradés et qui s'installe favorablement dans les zones arides et semi arides grâce à son aptitude à développer différentes stratégies d'adaptation aux contraintes hydriques [1, 63, 64]

1.6.1. Dans le monde :

Le caroubier est un arbre essentiellement méditerranéen d'importance écologique, industrielle et ornementale indiscutable [4, 15, 65, 66, 67, 68]. Il occupe le thermo méditerranéen aride supérieur à semi-aride supérieur [62]. On le rencontre à l'état naturel principalement en Espagne, Portugal, Maroc, Grèce, Italie, Turquie, Algérie, Tunisie, Égypte, et Chypre [4, 5]. Il a été introduit avec succès dans plusieurs autres pays ayant un climat méditerranéen. C'est le cas en Australie, aux États-Unis (Californie et Arizona), Mexico,... [4, 69]. On le trouve également aux Philippines et en Iran [2, 4] (Figure1.4).

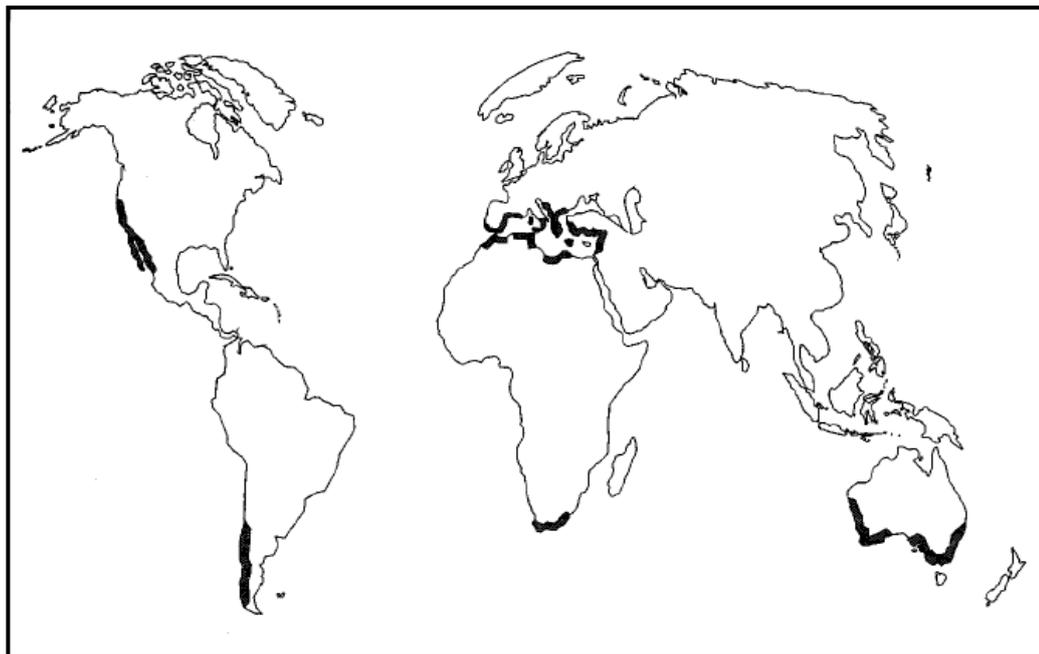


Figure 1.4: Centre d'origine et distribution du caroubier dans le monde [4].

1.6.2. En Algérie :

En Algérie, le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) est fréquemment cultivé dans l'Atlas Saharien et il est commun dans le tell [70]. On le trouve à l'état naturel en association avec l'amandier, l'olivier et le pistachier, dans les étages semi-aride chaud et subhumide, avec une altitude allant de 100m à 1300m dans les vallons frais qui le protègent de la gelée. Cette espèce tolère des températures allant de 5°C jusqu'à 20°C et une pluviométrie de 80 mm à 600 mm/an [71].

Suivant ces critères climatiques ; on a établi l'aire de répartition du caroubier en Algérie (figure1.5). Ses lieux de prédilection sont les collines bien ensoleillées des régions littorales ou sublittorales : Sahel algérois, Dhahra, Grande-Kabylie et Petite-Kabylie, vallée de la Soummam (1074 ha) et de l'Oued-Isser, collines d'Oran et des coteaux Mostaganem à étage semi-aride chaud, plaines de Bône, Mitidja et les vallées intérieures (1054 ha). Il descend jusqu'à Bou-Saâda, mais n'y porte pas de fruit, et dans la zone de Traras au Nord de Tlemcen (276 ha) [72].

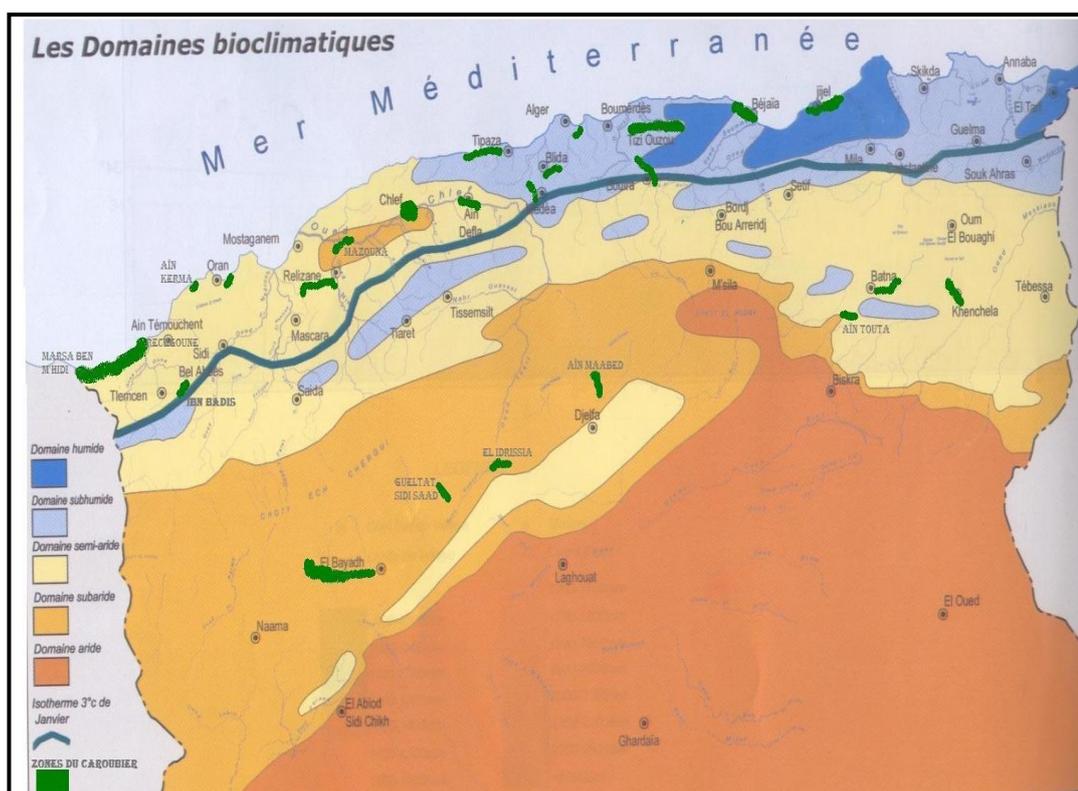


Figure 1.5 : Répartition du caroubier en Algérie suivant les domaines bioclimatiques [72].

1.7. Aire de production :

Selon les données du **FAOSTAT. (2010)**, l'aire totale de la production mondiale du caroubier est estimée à 102939ha (Tableau1.1). La plus grande superficie, 83574ha, est celle de l'Europe, contre une superficie estimée à 1000ha pour l'Algérie et 13460ha pour les pays d'Afrique du Nord [73].

Tableau 1.1 : Superficie occupée par le caroubier [73].

Pays	Superficie (ha) en 2004	Superficie (ha) en 2008
Algérie	1066	1000
Afrique du Nord	13526	13460
Europe	92218	83574
Monde	112711	102939

1.8. Propriétés et utilisation :

Le caroubier se présente comme une essence à la fois forestière et arboricole. Il est d'une grande importance économique, écologique et sociale [36]. Il est considéré comme l'un des arbres fruitiers et forestiers les plus performants puisque toutes ses parties (feuilles, fleurs, fruits, bois, écorces et racines) sont exploitées [56].

1.8.1. Arbre:

En raison de sa rusticité et de son adaptation aux contraintes de l'environnement, le caroubier est souvent utilisé, pour le reboisement et la reforestation des zones affectées par l'érosion et la désertification [35, 38, 74], pour lutter contre l'érosion des sols, comme brise vent et comme arbre ornemental compte tenu de sa couronne sphérique, et de son feuillage persistant, dense et brillant [1]. Les pieds mâles, qui ne fournissent pas de gousses sont les plus préférés dans le domaine d'ornementation [4].

1.8.2. Autres parties:

L'écorce et les feuilles du caroubier ont été utilisées en médecine comme laxatif, diurétique, anti diarrhéique, ainsi que pour le traitement des gastroentérites des bébés en période de lactation [75].

1.9. Production mondiale de la caroube:

La production mondiale de caroube est estimée à 191355.64 tonnes. Elle est essentiellement concentrée en Espagne, Italie, Maroc, Portugal, Grèce, Turquie, suivie de Chypre, Algérie, Liban, et en dernier la Tunisie (Tableau 1.2) [73].

Tableau 1.2 : Production mondiale de la caroube [73].

Pays	Production en tonnes (2004)	Production en tonnes (2008)
Espagne	67000	72000
Italie	24000	31224
Maroc	40000	25000
Portugal	20000	23000
Grèce	19000	15000
Turquie	14000	12100
Chypre	7000	3915
Algérie	4600	3600
Liban	3200	2800
Tunisie	1000	1000
Monde	182680	191167

Durant le siècle dernier, la production mondiale de caroube a connu une chute dramatique. Elle est passée de 650.000 t en 1945 [76], à 408500 t en 1997 [1]. La grande perte a été enregistrée en Espagne où la production a chuté de 400.000t en 1930 à 150.000t en 1990 [77].

1.10. Composition chimique de la caroube:

La gousse de caroube, fruit du caroubier, se compose d'une cosse appelée pulpe de caroube, enveloppant une graine, qui servait d'étalon de mesure pour les joailliers et les orfèvres dans les précédents siècles et qui est à l'origine du fameux 'carat' [1]. Cette pulpe représente de 73% jusqu'à 95% du poids total de la gousse. [78, 16] avec une moyenne de 85.2% [14].

Il a été observé que la composition chimique de la caroube dépend non seulement des facteurs technologiques ; comme les méthodes d'extraction et d'analyses, mais aussi du génotype de la plante (cultivar), origine géographique, les conditions climatiques et les procédures de récolte et de stockage [3, 4, 74, 79, 80, 81].

La valeur nutritionnelle de la gousse du caroubier est considérée similaire à celle de la plupart de céréales [82, 83]. Ce fruit présente une valeur énergétique importante (17,5 KJ/g de M.S) [67].

1.10.1. Pulpe :

La farine de cette pulpe ; comestible et délicieuse, a été considérée depuis longtemps comme un supplément alimentaire [13, 39, 67].

La composition chimique de la pulpe provenant de l'Egypte a été évaluée par **kamal et al.** [21] et est comme montre le tableau 1.3.

Tableau 1.3 : La composition chimique de la pulpe de caroube [21].

Composition chimique	Pourcentage %
Humidité	5.29
Protéines	6.34
Matières grasses brutes	1.99
Cendres	3.16
Fibre brute	7.30
Hydrates de carbone	75.92
Valeur énergétique, Kcal. / 100 g.	346.95

1.10.1.1. Sucres totaux :

La pulpe est très riche en en sucre (48- 56%) [4, 84], en particulier saccharose (32 à 38%), glucose (5 à 6%), fructose (5 à 7%) et maltose [85, 4]. Cette proportion se diffère selon la région géographique de récolte: les gousses d'Espagne présentant un taux plus élevé que les autres [1].

1.10.1.2. Fibres :

De 4.2 à 39.8% selon la méthode d'extraction [16, 17]. La fraction des fibres insolubles est composée de cellulose, hémicellulose et lignine [79, 86]. Des études récentes ont prouvé que les fibres de caroube diminuent le taux de cholestérol des sujets souffrant d'une hypercholestérolémie [18, 19].

1.10.1.3. Lipides :

Avec une teneur moyenne de 1.15% [14], l'huile de la poudre de caroube est constituée de 17 acides gras dont les majoritaires sont : l'acide oléique, linoléique, palmitique et stéarique [13, 21].

Ainsi, le taux des acides gras insaturés est de 66.98% alors que celui des acides gras saturés est de 29.46% [21].

1.10.1.4. Minéraux :

Les travaux les plus récents montrent que la pulpe contient une variabilité de minéraux. Elle est principalement très riche en calcium, phosphore et potassium [20].

Tableau 1.4 : Valeurs moyennes des minéraux de la pulpe [21].

Minéraux	Teneur (mg/kg)
Mn	10.24
Zn	24.71
Fe	381.80
Cu	4.84
Se	9.79
Ca	2123.00
Na	505.97
K	8637.67
P	2255.21
S	17577.80

1.10.1.5. Vitamines :

La pulpe de caroube contient les deux groupes de vitamines à savoir liposolubles et hydrosolubles (Tableau 1.5).

Tableau 1.5 : Teneur en vitamine de la pulpe [21].

Vitamines liposolubles	Teneur en µg / 100 g.
A	1.407
E	5.377
D	4.9
Vitamines hydrosolubles	mg / 100 g
C	830.08
B2	0.38
B3	185.68
B6	23.80
B9	41.97
B12	1.30

Aussi La pulpe de caroube est une bonne source de poly phénols (surtout tannins 16-20%) [4, 21, 67, 74, 79, 86, 87, 88].

1.10.2. Graine:

Il a été déterminé que les graines de la caroube n'ont aucune toxicité ou limitation pour la consommation [55, 89].

Quelques propriétés physiques de ces graines ont été évaluées par **Karababa et Coskuner**. tels que la teneur en eau et le poids de 1000 graines qui sont 13.8% et 158.56 g respectivement [36].

Sa composition chimique a été évaluée par **Bouzouita et al.** qui ont démontré qu'elle est pauvre en minéraux, en fibres et en protéines, par contre elle contient une quantité appréciable de lipides [90]. Ces derniers sont très importants et sont classés comme étant des constituants structuraux et de réserve [91, 2, 93].

La graine extrêmement dure, est composée de 30 à 33% d'enveloppe tégumentaire, 42 à 46% d'endosperme (albumen) et de 23 à 25% d'embryon (le germe) [4]. (Figure 1.6).



Figure 1.6 : Composition d'une graine de caroube (Originale).

L'enveloppe tégumentaire est considérée comme étant une source naturelle pour la production de poly phénols antioxydants [22, 94].

L'albumen est essentiellement constitué de gomme ou galactomannane (30 à 40%), qui est une molécule polysaccharidique composée de deux unités de sucre, mannose et galactose, à une proportion de 4:1, (Figure 1.7) [4, 36]. Ainsi, 100 kg de graines donnent en moyenne 20 kg de gomme pure et sèche ; appelée Sin 410. Les travaux d'**El Battal et al.** montrent que cette gomme renferme très peu de minéraux et de protéines (<2%) [95].

D'une autre part, le germe contient une proportion très élevée en protéines insolubles (96) et une teneur assez importante en arginine et glutamine [97]. L'étude menée par **Dakia et al.** indique clairement que les acides aminés essentiels sont présents en quantités satisfaisantes à l'exception du tryptophane [13].

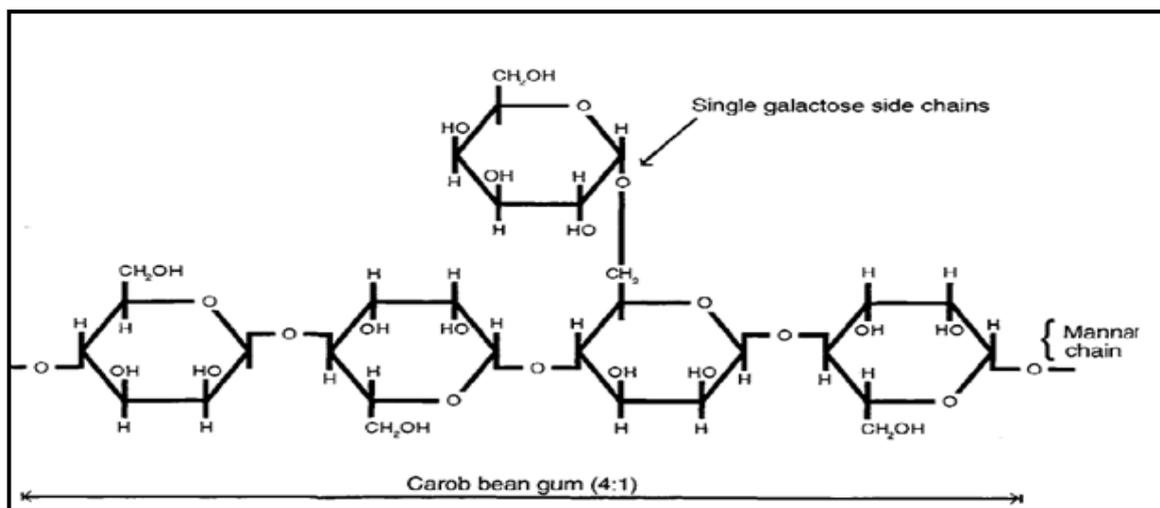


Figure 1.7 : La gomme de caroube [4].

1.11. Intérêts et utilisation de la caroube:

1.11.1. Pulpe :

La farine, obtenue en séchant, torréfiant et moulant les gousses après les avoir débarrassées de leurs graines, est employée en alimentation humaine surtout en agro-alimentaire, dans la préparation de jus sucrés et de biscuits, pains, bonbons,... [5].

A des fins économiques, elle est très utilisée pour la préparation du chocolat, soit un remplaçant idéal de cacao [2], de part de sa composition chimique [98]. Elle est moins calorifique et ne contient ni caféine ni théobromine : deux alcaloïdes à action excitante sur l'organisme [99, 100]. Elle est aussi utilisée pour la production industrielle d'alcool par fermentation [1]. C'est le cas d'éthanol [6, 7, 8].

De ses sucres est issue une valorisation traditionnelle, communément consommée dans les pays de l'Orient tels que la Syrie et le Liban: la mélasse de caroube. Elle est utilisée comme sirop en alimentation humaine [1]. Par exemple en Egypte, ce sirop est employé pour confire les fruits [9].

En Portugal, la pulpe est utilisée pour préparer une boisson fermentée [101].

En outre, cette pulpe sucrée est employé depuis longtemps, comme nourriture de bétail (produit énergisant) à côté d'autres aliments comme la farine d'orge [1].

Selon les travaux de **Lizardo et al.** il semble que la farine de la caroube soit un produit parfaitement adapté à l'alimentation des porcelets. Son incorporation dans

les régimes s'avère très utile dans le soutien de la consommation, de la croissance et de la santé en post-sevrage. Par conséquent, elle a une influence positive sur la performance et la santé des animaux soumis à un régime alimentaire [11].

Des études récentes démontrent que la présence des poly phénols et des fibres dans des préparations à base de pulpe de caroube a divers bénéfices pour la santé humaine [84].

Etant riche en ces composés polyphénoliques, la pulpe possède un pouvoir nématocide démontré par les travaux **d'El Allagui et al.** [102].

Dans le même contexte, une expérimentation animale sur des souris a démontré la capacité, que possède des extraits de pulpe de caroube, d'inhiber la prolifération cellulaire des carcinomes hépatocellulaires [68] et les adénocarcinomes du colon [103].

Par ailleurs, elle joue un rôle effectif dans la suppression des parasites intestinaux [104], et dans le traitement des diarrhées [105].

1.11.2. Graine :

Etant donné que la gomme est le produit le plus pré pondéralement contenu dans la graine, et pendant le processus d'extraction de ce dernier, un sous-produit est généré : le germe. La farine de ce dernier est très riche en protéines (jusqu'à 50%) et est très utilisée dans le domaine de l'alimentation du bétail au niveau mondial [1], ainsi qu'en alimentation humaine comme ingrédient dans les préparations infantiles [11]. Cet usage en cours présente de nouveaux développements, tout particulièrement pour son absence en gluten [1].

La gomme ; extraite de l'endosperme blanc et translucide de la graine, est un polysaccharide naturel qui est doté de diverses propriétés importantes, à savoir une haute viscosité dans l'eau, même à température et à pH variables [106], et une capacité de former à partir d'une solution très diluée de stable solution visqueuse [1].

Ce polysaccharide est exploité voir ses propriétés synergiques avec d'autres polysaccharides d'origine végétale ou marine, comme les carraghénanes, agar et le xanthan. Il a la capacité de former des gels plus fermes et plus élastiques [107].

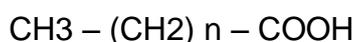
Ainsi, cette gomme est utilisée dans l'industrie agro-alimentaire comme additif naturel, Sin 410 [1, 84, 108]. Elle est extrêmement employée dans la fabrication des glaces, dont elle améliore la texture, la tenue dans le temps à la température, la tenue à l'acidité tout en réduisant les effets de cristallisation de l'eau [1].

Aussi en industrie pharmaceutique [10] elle est principalement utilisée contre les diarrhées. En effet dans une étude, il a été montré que l'administration de jus des graines de caroube en association avec la solution de réhydratation orale à des enfants souffrant de diarrhée aiguë et âgés de 4 à 48 mois, raccourcissaient la durée de l'épisode diarrhéique et diminuait la fréquence des selles et les besoins en solution de réhydratation [109].

Cette gomme est aussi utilisée dans le domaine cinématographique, textile et cosmétique [1].

2.1.2. Les acides gras saturés :

La formule chimique générale des acides gras saturés est la suivante :



Ils sont appelés ainsi, car les atomes de carbones sont saturés en hydrogène.

La plupart des acides gras retrouvés à l'état naturel sont à nombre pair de carbones et à chaîne linéaire. Il en existe néanmoins quelques-uns à nombre impair de carbones et à chaîne ramifiée. Le point de fusion des acides gras augmente avec la longueur de la chaîne carbonée ; ainsi, les acides gras à courte chaîne sont liquides à température ambiante, alors que les acides gras pourvus de 10 atomes de carbone ou plus sont solides [132].

Ils assurent une grande partie de la dépense énergétique, mais lorsque consommés en excès, ils pourraient augmenter le taux des LDL (cholestérol sanguin) et peuvent durcir les artères [133].

2.1.3. Les acides gras insaturés :

Au sein de cette catégorie, on distingue les acides gras mono insaturés (acides mono éniques) et polyinsaturés (poly éniques).

2.1.3.1. Les acides gras mono insaturés : (AGMI)

Les acides gras monoinsaturés sont caractérisés par la présence d'une double liaison au niveau de la chaîne carbonée [136].

Ils diminuent le cholestérol total et le mauvais cholestérol (LDL) et augmentent le taux du bon cholestérol (HDL) [133].

2.1.3.2. Les acides gras polyinsaturés: (AGPI)

Les acides gras appartenant à ce groupe sont caractérisés par la présence d'au moins deux doubles Liaisons dans la chaîne carbonée.

Quelques-uns sont classés comme essentiels car l'organisme humain ne peut pas les synthétiser et donc doivent être obligatoirement apportés par voie exogène [132, 137].

Ils ont des fonctions importantes, mais le terme « essentiel » est appliqué seulement aux acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont nécessaires pour une bonne santé [134]. En effet, ils maintiennent les lipides sériques à des niveaux adéquats. Par exemple, l'acide linoléique abaisse le taux des LDL. Mais lorsque consommé en excès, cet acide augmente la fragilité de ces lipoprotéines pour la peroxydation [138].

Les AGPI sont une part intégrale de la membrane cellulaire ; ils impactent significativement sur la fluidité membranaire et la fonction cellulaire. Les AGPI servent de constituants majeurs des phospholipides, des triglycérides et des esters de cholestérol.

Dans un autre contexte, il a été démontré que les AGPI sont biologiquement actifs contre les bactéries [139] surtout les Gram⁺ [140].

La règle générale est de dénommer un acide gras par le nom de l'hydrocarbure dont il dérive [141].

2.1.3.3. Nomenclature officielle :

La numérotation officielle numérote la chaîne carbonée à partir de l'atome de carbone du groupement carboxyle. Ainsi, la position de la double liaison est définie par le numéro du premier atome de carbone qui en est porteur [119].

Exemple: $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_7\text{-COOH}$

C'est l'acide octadécadiène 9-12 oïque. En abrégé, on le note C18:2 ; 9, 12 [142, 143].

2.1.3.4. Nomenclature oméga :

Si la nomenclature officielle apporte une information précise et complète, elle peut se révéler un peu lourde à l'usage et peu complexe à la lecture. C'est pourquoi, lorsque le détail dans un sujet est inutile et que l'on souhaite essentiellement évoquer les filiations dans les différentes familles d'acides gras polyinsaturés. Certains auteurs préfèrent utiliser la nomenclature ω . La désignation ω tend à être remplacée dans l'usage par la dénomination n-. Ainsi, la série ω -6 correspond à la série n-6 [144].

La nomenclature oméga numérote la chaîne à partir du groupement méthyl (CH_3) terminal et non plus à partir du groupement carboxyle. L'intérêt de cette numérotation réside dans la distinction de quatre familles d'acides gras dont seule la dernière (série n-9) peut-être synthétisée par les mammifères sans l'apport d'un des acides gras de la famille considérée. Ces familles sont [133]:

- La famille $\omega 3$: l'acide linoléique.
- La famille $\omega 6$: l'acide linoléique.
- La famille $\omega 7$: l'acide palmitoléique.
- La famille $\omega 9$: l'acide oléique.

2.1.4. Les vitamines et les lipides:

Selon **Gunstone** [137], les lipides en général sont sources des vitamines liposolubles qui sont :

- Vitamine A : rétinol, essentiel pour la vision.
- Vitamine D : vitamine anti rachitisme.
- Vitamine E : tocophérol, antioxydant très puissant.
- Vitamine K : nécessaire pour la coagulation du sang.

2.1.5. Besoins nutritionnels en lipides :

La fonction principale des lipides consiste à fournir une quantité d'énergie suffisante pour le métabolisme cellulaire. Parmi les nutriments, ce sont les lipides qui ont le plus fort rendement calorique [133].

Ainsi, la plupart des graisses alimentaires s'accumulent sous forme de réserve, dans le tissu adipeux [133].

Les acides gras sont aussi, les composants de base des phospholipides (PL) membranaires qui jouent un rôle structural et fonctionnel majeur dans les membranes [133].

Les acides gras interviennent également dans les voies de signalisation cellulaire notamment celle des eicosanoïdes. Depuis les années 90, ils sont aussi considérés comme des molécules de signalisation impliquées dans la régulation de

la transcription de gènes, notamment des gènes clés du métabolisme lipidique et glucidique [145].

Dans le contexte alimentaire, ils ajoutent une composante très indispensable ; la palatabilité et la flaveur [137].

2.2. Les huiles végétales :

Le mot « huile » se rapporte aux triglycérides qui se trouvent dans leur état liquide à température ambiante. Les paramètres qui différencient les huiles et affectent leurs propriétés physiques et chimiques sont le nombre de carbones qui composent les acides gras, le degré d'insaturation et enfin, la stéréochimie des doubles liaisons [110].

2.2.1. Types des huiles :

La détermination du degré d'insaturation, obtenu par la mesure de l'indice d'iode permet de diviser les huiles en trois catégories :

- Les huiles siccatives : indice d'iode au-dessus de 150 (huile de lin).
- Les huiles semi-siccatives : indice d'iode compris entre 125 et 150 (ex : huile de soja ou de tournesol),
- Les huiles non-siccatives : indice d'iode en dessous de 125 (ex : huile de palme, de canola, d'olive ou de colza) [110].

2.2.2. Composition des huiles végétales :

Les corps gras d'origine végétale sont essentiellement des glycérides [111] dont la composition dépend de la nature de la plante, de ses conditions de culture, du sol et de la saison [110].

Une fraction quantitativement mineure, appelée fraction insaponifiable, est également présente dans ces corps gras. D'autres composés n'appartenant pas à ces deux catégories peuvent y être présents à de faibles proportions [111].

2.2.2.1. La fraction saponifiable :

De 98,5 jusqu'à 99,5% des huiles sont des composants saponifiables. Cette fraction renferme en majeure partie des triglycérides, mais des mono et des

diglycérides. Ainsi, des acides gras libres et des phospholipides y sont présents en faibles quantités [111, 112].

2.2.2.1.1. Triacylglycerols :

Représentent 98 à 99% des huiles. Ce sont des acides gras estérifiant un alcool ; le glycérol. Généralement, les acides gras occupant le deuxième carbone de ce dernier sont insaturés. Mais d'autres acides saturés peuvent l'occuper lorsque le taux des saturations de l'huile est élevé [113].

2.2.2.1.2. Mono et diacylglycerols:

Les mono et les diacylglycerols représentent 0.2 et 1.3 % du total des acides gras, respectivement [113].

2.2.2.1.3. Phospholipides:

Les phospholipides présents dans les corps gras végétaux bruts (jusqu'à 2% de certaines huiles), sont essentiellement des phosphoglycérides (c'est à dire des dérivés du phosphoryl 3 glycérol). Il existe aussi une fraction des phospholipides comportant des motifs glucidiques [111].

2.2.2.1.4. Cérides:

Les cérides sont des esters d'acides gras et d'alcools de masse moléculaire suffisamment élevée pour qu'ils soient insolubles dans l'eau (de C₁₆ à C₃₆). Parmi eux, on compte : les cires naturelles (esters d'acides gras et mono alcools aliphatiques) [111].

2.2.2.1.5. Stérides:

Ce sont des esters de stérols, de méthyl-stérols ou d'alcools triterpéniques), les caroténocérides (esters d'acides gras et d'hydroxycaroténoïdes ou xanthophylles),...[111].

2.2.2.2. La fraction insaponifiable :

Elle représente 0,2 à 2% d'un lipide non raffiné. Ses constituants chimiques sont extrêmement variés en nature et en proportions. Les principaux sont des hydrocarbures divers, des composés terpéniques (alcools triterpéniques, 4-

méthylstérols, stérols,...), des alcools gras, des vitamines liposolubles (A, D, E (tocophérols), des pigments, et des constituants extrêmement divers [111, 113].

2.2.2.2.1. Pigments :

Les principaux pigments présents dans les huiles végétales sont les caroténoïdes [113,114] dont les principaux sont β -carotène et lutéine, xanthophylles [115].

Ainsi, la couleur verte de certaines huiles est principalement due à la présence d'un autre type de pigment : les chlorophylles. La phéophytine α est la plus abondante quoi que d'autres pigments chlorophylliens sont présents ; chlorophylle α , chlorophylle β et la phéophytine β [113].

2.2.2.2.2. Composés volatiles et aromatiques:

Ce sont les principaux responsables de l'arôme et de la flaveur des huiles végétales. Il existe plus d'une centaine de composés, dont on peut citer les alcools, aldéhydes, phénols, terpènes [116].

2.2.2.2.3. Protéines:

Il a été prouvé que les huiles végétales contiennent des fractions protéiques. Mais leurs teneurs varient largement tous dépend de l'huile et sa méthode d'extraction [113, 117].

2.2.2.2.4. Tocophérol :

Les antioxydants sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique,...) et sont rajoutés aux huiles dans l'industrie alimentaire. Mais ils peuvent être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier et du chêne, sésamol, flavonoïdes, certaines huiles essentielles,...).

Les huiles peuvent renfermer une quantité plus ou moins importante de vitamines liposolubles. Plus particulièrement, la vitamine E, présente dans tous les lipides naturels sous différentes formes moléculaires, est constituée des tocophérols et des tocotriénols.

C'est l'anti-oxydant majeur des milieux lipidiques [118]. Les tocophérols quoiqu'en fraction mineure, sont intéressants en raison de leurs pouvoirs anti-oxydant et contribue à la stabilité des huiles [119, 120, 121] et aussi vitaminique principalement (vitamine E). Cette dernière, dont les propriétés biologiques sont nombreuses, est utilisée dans plusieurs domaines notamment en cosmétologie et dans plusieurs domaines relevant de la médecine : cardiologie [122, 123], dans des anti-inflammatoires [124, 125], en cancérologie [126, 127] et en gériatrie [128, 129].

2.2.3. Caractéristiques des huiles végétales :

Les huiles végétales sont caractérisées par la détermination de leurs propriétés physicochimiques : densité, viscosité, teneur en eau, fraction insaponifiable, couleur, indices d'iode, d'acide, de saponification, et d'autres [130]. Quelques propriétés et leurs principes de déterminations seront brièvement définis dans le troisième chapitre.

CHAPITRE 3 :

MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre rapporte l'ensemble de matériel utilisé, des techniques adoptées pour la caractérisation des matières premières et les huiles végétales ainsi que les tests *in vitro* dont le but est de mettre en évidence les activités biologiques de ces dernières.

3.1. Matériel :

3.1.1. Matériel biologique:

3.1.1.1. Matériel végétal:

Notre étude a été réalisée sur des gousses de caroube mures *Ceratonia siliqua L.* Environ 10 kg ont été récoltés au mois de septembre 2013, de la région de Soumaa à Blida.



Figure 3.1: (A) gousses de caroube et farine de la pulpe. (B) graines et farine des graines de caroube.

3.1.1.2. Microorganismes :

Les souches bactériennes et fongiques sont des souches identifiées (ATCC ; American Type Culture Collection). Elles ont été fournies aimablement par les responsables de laboratoire de microbiologie de l'institut Pasteur de Dely Brahim.

Le choix des bactéries a été porté sur quatre souches fréquentes en pathologie humaine. Ces espèces sont souvent responsables de toxi-infections

alimentaires et d'intoxication constituant un problème majeur de santé publique. Les souches bactériennes et fongiques sont mentionnées le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Codes de références des souches microbiennes.

La souche	Le code de référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 28923
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 4404540
<i>Candida albicans</i>	ATCC 1023

3.1.2. Matériel non biologique :

L'ensemble des appareils, verrerie, réactifs, produits chimiques et milieux de culture sont présentés dans l'appendice A.

3.2. Méthodes :

3.2.1. Identification de l'espèce :

Au cours de cette étude, nous avons utilisé de la caroube provenant d'un caroubier spontané de la région de Soumaà. Cet arbre se trouvant en association avec quelques arbres d'oliviers et d'eucalyptus, a été identifié par des botanistes du département des sciences agronomiques ; université de Blida 1 et de l'institut National d'agronomie (El-Harrach).

3.2.2. Préparation du matériel végétal :

Les gousses mures fraîchement récoltées ont été débarrassées manuellement de leurs graines. Les deux sous-produits (pulpe et graines) ont été broyés séparément à l'aide d'un broyeur de type Retsch Mühle, puis passés sur un tamis de 250 µm. [146]. Ensuite, les deux moutures sont conditionnées dans des flacons en verre, et conservés au réfrigérateur pour des analyses ultérieures.

Dans notre étude, nous avons réalisé un ensemble d'analyses et qui sont récapitulées dans la figure 3.2

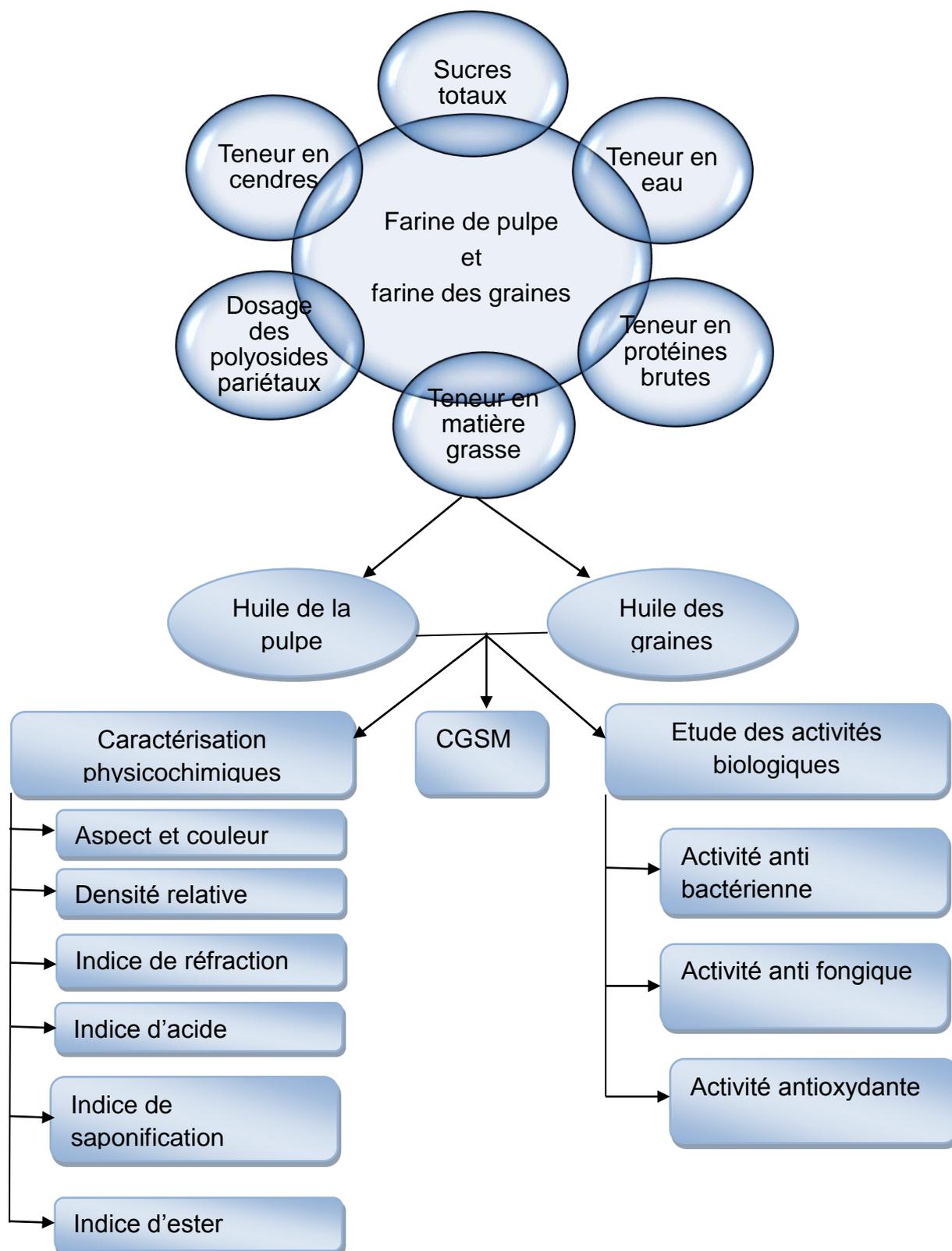


Figure 3.2 : Schéma général de l'étude expérimentale (Original).

3.2.3. Détermination de la composition chimique de la caroube:

Il est à signaler que pour chaque détermination, on a effectué trois répétitions. Le résultat représente la moyenne de ces trois essais.

3.2.3.1. Pulpe :

3.2.3.1.1. Détermination de la teneur en eau:

➤ Principe :

On procède à une dessiccation de l'échantillon à analyser dans une étuve à une température de 103 ± 2 °C, sous la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient d'opérer dans des vases de tare, placés dans un dessiccateur.

➤ Mode opératoire : [147]

- Introduire dans chaque vase de tare 1 ± 0.01 g de l'échantillon frais : c'est le poids P1.
- Placer les dans une étuve réglée à 103 ± 2 °C pendant trois heures.
- Peser les vases de tare et répéter l'opération avec une heure d'intervalle entre chaque pesée jusqu'au poids constant ou à une différence de 2mg entre deux pesées successives.

➤ Expression des résultats :

La teneur en eau (%) du matériel végétal est donnée par la formule suivante:

$$H\% = \frac{(M_1 - M_2)}{P} \cdot 100$$

Soit :

H % : Humidité.

M₁ : Masse de la capsule + matière fraîche avant étuvage.

M₂ : Masse de l'ensemble après étuvage.

P : Masse de la prise d'essai.

A partir de la teneur en eau, on détermine le taux de matière sèche (MS%) qui est donné par la formule suivante :

$$MS\% = 100 - H\%$$

3.2.3.1.2. Détermination de la teneur en cendres :

➤ Principe :

La poudre est calcinée à 550 °C dans un four à moufle jusqu'à obtention d'une cendre blanchâtre de poids constant.

➤ Mode opératoire :

- Ce dosage est effectué selon la méthode **NF V05-113,01972**.
- Dans des capsules en porcelaine, peser 2 ± 0.01 g d'échantillon broyé ;
- Placer les capsules dans un four réglé à 550 ± 15 °C durant 5 heures jusqu'à l'obtention d'une couleur grise, claire ou blanchâtre;
- Retirer les capsules du four et les mettre à refroidir dans le dessiccateur, puis les peser.

➤ Expression des résultats :

$$MO\% = \frac{(M1 - M2)}{P} \times 100$$

Soit :

MO % : Matière organique.

M1 : Masse de la capsule contenant la prise d'essai.

M2 : Masse de la capsule contenant les cendres.

P : Masse de la prise d'essai.

La teneur en cendres (C%) est obtenue en appliquant :

$$C\% = 100 - MO\%$$

3.2.3.1.3. Dosage des protéines brutes :

➤ Principe :

Pour déterminer la quantité des protéines contenues dans un échantillon, on procède à un dosage de l'azote total par la méthode de **Kjeldahl** qui a été

développée en 1883 par un chimiste danois « **Johan KJELDAHL** ». Cette dernière s'effectue en trois phases [148] :

- Digestion (minéralisation).
- Distillation.
- Titration.

➤ Mode opératoire :

- Minéralisation :

- Dans un matras de **Kjeldahl**, on introduit :
 - 1 ±0.01g du matériel biologique broyé.
 - 2 ±0.01g de catalyseur (appendice B)
 - 25 ml d'acide sulfurique concentré à 97 % (H₂SO₄).
 - 2 ml d'eau oxygénée à 30 % (H₂O₂).

On chauffe le matras jusqu'à ce que la couleur noire se transforme en une couleur limpide, à ce moment-là l'azote organique est transformé en azote minéral.

Ensuite, on laisse refroidir et on transpose l'échantillon minéralisé dans une fiole, on lave le matras avec l'eau distillée tout en ajustant le volume jusqu'à 100 ml.

- Distillation :

Elle se fait dans une unité de distillation Velp scientifica UDK 127.

-Dans un matras, on introduit 10 ml du contenu de la fiole auquel on additionne 20 ml d'eau distillée et 30 ml de la soude à 35 %.

- En parallèle, on prépare une solution d'acide borique à 0,1N avec 10 gouttes d'Indicateur de Tashiro (de couleur rose- violette en présence d'un milieu acide et verte dans le cas d'un milieu alcalin) (appendice C)
- Cette phase est arrêtée au bout de 4 minutes à compter du début de l'ébullition.

- Titration :

Puisqu'on utilise l'acide borique comme solution de récupération, on va alors titrer l'excès des anions de borate avec la solution de NaOH à 0,1N jusqu'à changement de la coloration du vert au rose-violet dû au virage de l'indicateur de Tashiro.

➤ Expression des résultats :

L'azote total est calculé suivant la formule représentée ci- dessous :

$$(\% \text{ N total}) = \frac{(\text{VB} - \text{VE}) \times 0.0014 \times 10}{\text{M}} \times 100$$

Dont :

%N total : Pourcentage d'azote total.

VB : Volume de NaOH 0.1N utilisé pour un essai blanc (ml).

VE : Volume de NaOH 0.1N utilisé pour la titration de la solution à doser (ml).

0.0014 : Facteur de correction.

100 : Coefficient du pourcentage.

10 : Coefficient du volume total de la solution à doser.

M : Masse de la prise d'essai.

Le taux d'azote total est converti en taux de protéines brutes selon la formule suivante :

$$\text{Protéines brutes (\%)} = \% \text{N total} \times 6.25$$

Où 6,25 est le facteur de conversion basé sur le taux moyen d'azote des protéines.

3.2.3.1.4. Dosage des sucres totaux :

➤ Principe :

Le dosage des sucres totaux est effectué par la méthode de phénol / acide sulfurique selon la méthode décrite par **Dubois et al.** [149].

Cette dernière nécessite une hydrolyse acide qui permet la rupture de toutes les liaisons glucidiques dans le polyoside.

Le principe du dosage se base sur la condensation des produits de déshydratation des oses avec un chromogène qui est le phénol. A ce moment- là, il se forme des chromophores de couleur jaune-orange, leur apparition est suivie en mesurant l'augmentation de la densité optique à 490nm.

La teneur des sucres est exprimée en $\mu\text{g} / \text{ml}$ (convertie en grammes / litre) de α D (+) Glucose à partir d'une courbe d'étalonnage.

➤ Mode opératoire :

- On additionne à $0,5 \pm 0,01\text{g}$ d'échantillon, 20 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) 0,5 M, puis on place l'ensemble dans une étuve réglée à 105°C pendant 3 heures.
- On transpose la solution dans une fiole de 500ml tout en ajustant le volume par de l'eau distillée jusqu'à 500ml.
- On filtre la solution puis on réalise trois dilutions au 1/3.
- Dans des tubes, on met 1ml de chaque dilution, ensuite on ajoute dans chaque tube 1ml de phénol à 5 % et 5ml d'acide sulfurique à 98 %.
- Les tubes sont maintenus dans l'étuve pendant 5 minutes à 105°C , puis laissés à l'obscurité pendant 30 minutes.
- Enfin, à l'aide d'un spectrophotomètre, on lit la densité optique à une longueur d'onde de 490 nm.
- D'une autre part, on trace la courbe d'étalonnage comme s'est décrit dans l'appendice D.

3.2.3.1.5. Fractionnement et dosage des polyosides pariétaux :

Nous avons opté comme méthode celle de VAN SOEST [150].

➤ Principe :

Le principe consiste à fragmenter les différents constituants de la paroi végétale grâce à des détergents appropriés.

Cette méthode constitue une amélioration de dosage des structures chimiques de la cellule végétale. De ce fait elle tend à s'imposer au niveau international.

Sur le même échantillon, elle permet de doser :

- NDF (Neutral Détergent Fiber) ou paroi végétale totale. C'est le résultat de l'hydrolyse de l'échantillon en milieu neutre avec une solution détergente. Ce résidu renferme encore, néanmoins, des matières azotées et des matières minérales emprisonnées dans les parois ; (NDF= cellulose brute + hémicellulose + lignine) ;

- ADF (Acid DétergentFiber) C'est le résultat de l'hydrolyse de l'échantillon ou du résidu NDF, en milieu acide, en présence de cétyle-triméthyl-ammonium-bromide (CTAB). Ce détergent solubilise le contenu cytoplasmique du végétal et les hémicelluloses. En règle générale, ce résidu contient la totalité de la cellulose vraie, de la lignine en majeure partie, une fraction variable des hémicelluloses, des substances pectiques et une fraction des matières minérales (ADF= cellulose + Lignine).

- La lignine : estimée après destruction, par H_2SO_4 à 72 %, de la cellulose vraie. Le résidu appelé ADL (Acid Détergent Lignin) contient de la lignine et de la cutine.

➤ Préparation des détergents :

Les détergents utilisés ont été préparés comme montre le tableau 3.2, pour deux litres.

Tableau 3.2 : Composition des détergents (2 litres).

NDF	60 g de sodium lauryl sulfate.
	37.2 g de dissodium éthylène diamine tétra-acétate dihydraté (EDTA).
	13.62 g de sodium borate decahydrate.
	9.16 g de dissodium hydrogène phosphate anhydre.
ADF	40 g de céthyle triméthyle ammonium bromide.
	55.54 ml d'acide sulfurique.

➤ Mode opératoire :

- 1 ± 0.01 g d'échantillon est mis dans 100 ml de NDF, le mélange est porté à l'hydrolyse pendant 1 heure.
- Après filtration et lavage du produit obtenu, ce dernier est porté à l'étuve réglée à 105°C pendant 24 heures. Et ceci dans des creusets filtrants pesés au préalable (P_0). Le total est pesé comme P_1 .
- on gratte le creuset et on met le produit dans le ballon. Ensuite, on verse 100ml d'ADF.
- Une fois filtré, nous procédons au lavage de l'échantillon avec de l'eau chaude, puis l'étuver à 105°C pendant 24 h.
- On pèse ensuite le creuset ; P_2 (cellulose, lignine et matière minérale).
- Après l'attaque du produit pendant trois heures avec H_2SO_4 à 72%, le produit est lavé avec l'eau distillée et étuvé à 105°C pendant 24h. le résidu pesé P_3 (lignine et matière minérale) est incinéré pendant trois heures à 550°C pour déterminer les cendres insolubles obtenues P_4 .

➤ Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche et sont calculés à partir des formules suivantes :

$$\text{NDF} = \frac{P_1 - P_0}{E} \times 100$$

$$\text{ADF} = \frac{P_2 - P_0}{E} \times 100$$

$$\text{Hemicellulose} = \text{NDF} - \text{ADF}$$

$$\text{Cellulose} = \frac{P_2 - P_3}{E} \times 100$$

$$\text{Lignine} = \frac{P_3 - P_4}{E} \times 100$$

$$\text{Cendres} = \frac{P_4 - P_0}{E} \times 100$$

Avec :

E : la prise d'essai.

P₀ : poids en g de creuset vide.

P₁ : P₀+résidu.

P₂ : poids en g de creuset après lavage à l'eau chaude (cellulose, lignine, matières minérales).

P₃ : poids en g de creuset après l'attaque acide (lignine et matière minérale).

P₄ : poids en g de P₃ après incinération.

3.2.3.1.6. Dosage et extraction de la matière grasse :

➤ Principe :

L'extraction se fait à l'aide d'un extracteur de type soxhlet (figure 3.3). Cette technique consiste à utiliser un solvant organique apolaire (éther de pétrole, l'hexane ou l'acétone). L'appareil contient :

- Un ballon contenant le solvant qui doit être porté à ébullition.
- Une partie intermédiaire dans laquelle est placée une cartouche en papier filtre épais contenant le corps à épuiser.
- Un tube siphon et un tube d'adduction.
- Un réfrigérant.

Les vapeurs chaudes du solvant passent par le tube adducteur se condensent plus haut dans le réfrigérant et retombent dans la cartouche contenant la mouture à épuiser. Il y a alors macération et extraction des huiles de mouture.

Le solvant condensé s'accumule dans la partie intermédiaire jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque le siphonage et le solvant retombe dans le ballon d'ébullition. Le cycle continue jusqu'à l'extraction complète de la matière grasse. Le solvant contenu dans le ballon est alors saturé en huile extraite. Il suffit alors d'évaporer le solvant à l'aide d'un appareil évaporateur rotatif pour recueillir les huiles et récupérer le solvant qui pourrait être réutilisé plusieurs fois.

➤ Mode opératoire : [151]

- à l'aide d'une balance de précision, nous avons pesé 50 ± 0.01 g de la mouture, la placée dans une cartouche en papier filtre épais. Elle est ensuite placée dans la partie intermédiaire de l'appareil.

- Un ballon rodé à fond plat d'une capacité de 1000 ml est rempli par 550 ml de solvant (l'éther de pétrole) [152].

- Ce ballon est inséré à l'extracteur, ensuite l'appareil est placé sur une plaque chauffante avec une alimentation continue du réfrigérant par l'eau froide.

- six heures d'extraction seront suffisantes pour extraire toute la quantité d'huile de nos échantillons.

- Le solvant est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif.

➤ Expression des résultats :

Le rendement en huile déterminé après extraction, et calculé selon la formule suivante :

$$\%R = \frac{P1 - P2}{PE}$$

Soit :

P_1 : poids du ballon après extraction contenant huile en gramme.

P_2 : poids du ballon vide (g).

PE : prise d'essai (g).

Remarque : après le calcul du rendement en matière grasse, l'extraction est poursuivie de la même manière et dans les mêmes conditions expérimentales.



Figure 3.3 : Appareil à soxhlet (Photo originale).

3.2.3.2. Graines :

De la même façon, et afin de déterminer la composition chimique des graines de caroube, nous avons opté pour les mêmes protocoles que ceux décrits précédemment (ceux de la pulpe).

- Détermination de la teneur en eau
- Détermination de la teneur en cendres
- Dosage des protéines brutes
- Dosage des sucres totaux
- Fractionnement et dosage des polysides pariétaux
- Dosage et extraction de la matière grasse

3.2.4. Analyse des huiles végétales (de pulpe et des graines):

3.2.4.1. Caractérisation par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse « CG/SM » :

La Chromatographie en phase gazeuse (CPG) est la technique la plus couramment utilisée pour l'identification des acides gras en les transformant en méthyl esters [137].

3.2.4.1.1. La transesterification :

C'est la transformation des triesters du glycérol qui constituent un corps gras en des mono esters du méthanol ayant des points d'ébullition moins élevés. L'analyse par CPG peut se faire alors à des températures plus basses.

3.2.4.1.2. Chromatographie en phase gazeuse :

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisé par chauffage sans décomposition. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs ont contribué à rendre la CPG incontournable pour la caractérisation des huiles.

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : injecteur, colonne capillaire dans le four et un détecteur. Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en split ou avec division en flux. Il est utilisé pour l'analyse de solution concentrée. L'injection se fait à haute température. L'échantillon est rapidement introduit dans l'injecteur ou il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur (hélium). Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. Ce procédé permet de faire en sorte qu'une fraction importante de flux gazeux soit évacuée, diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne et évitant de saturer la phase stationnaire [153].

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique, la colonne analytique. Elle peut être de 2 types : colonne remplie ou capillaire. Les substances de l'échantillon traversent la totalité de la colonne ou est placée la phase stationnaire.

Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire. De leur volatilité si cette dernière est apolaire. Leur différence de propriétés physicochimique leur confère des vitesses d'élution et ils sont donc séparés en fonction du temps. Ils arrivent à l'extrémité de la colonne, ils sont alors détectés et enregistrés. La CPG permet donc de séparer un mélange gazeux complexe par succession continue d'équilibre entre phase mobile, gazeuse et phase stationnaire [154].

3.2.4.1.3. Spectrométrie de masse (SM):

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux spectromètres de masses ; tous ont en commun trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur. La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. En couplage avec la CPG, où les composés sont élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à ionisation électronique (IE) ou à ionisation chimique (IC). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250 °C) pour éviter la condensation des substances [153].

Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Dans le spectromètre de masse, les ions sont séparés selon leur rapport « masse/charge » à l'aide d'un champ magnétique ou électrique [154]. Le faisceau d'ion ayant traversé l'analyseur de masse est détecté et transformé en un signal utilisable.

3.2.4.1.4. Couplage chromatographe gazeuse/spectrométrie de masse :

Le couplage CPG/SM est aujourd'hui une des techniques parmi les plus utilisées de la chimie analytique. L'association des deux techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant.

La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est due à la grande différence de pression. En effet, la SM requiert un niveau de pression très bas, alors que la CPG se déroule à un niveau de pression plus élevé. Ainsi le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles et huiles essentielles [155]. Le bombardement de substance par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70 eV provoque leur ionisation et leur fragmentation. Les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masses ainsi obtenus sont ainsi comparés avec ceux des produits de références contenus dans des bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres [153].

➤ Mode opératoire :

- Préparation des esters méthylés [156, 157] :

- préparer une solution de 0.2 ± 0.01 g d'huile dans 4ml d'hexane et agiter.
- A l'aide d'une pipette, prendre 0.2ml de soude méthanolique 2N.
- Boucher le tube et agiter pendant 10 secondes.
- Agiter puis neutraliser avec 0.2ml d'acide chlorhydrique 2N dans du méthanol.
- Agiter et laisser décanter.

L'analyse est réalisée dans des conditions opératoires déterminées, résumées dans le tableau suivant :

Tableau 3.3: Conditions opératoires pour la CG/MS.

Conditions opératoires de la CG	
Passeur d'échantillon	Automatique
Volume injecté	1 μ L
Gaze vecteur	Hélium
Colonne utilisée	ELITE-5MS (longueur 30m, diamètre 0.25mm)
Température d'injection	250°C
Température de la ligne de transfert	200°C
Conditions opératoires de MS	
Mode d'ionisation	Impact électronique(+)
Potentiel d'ionisation	70eV
Température de la source	200°C
Balayage et scan (m/z)	25-500UMA

- Injection :

- à l'aide d'une seringue de 10µl, prélever 1µl du surnageant.
- Injecter et démarrer la programmation.
- Rincer la seringue à l'hexane.

3.2.4.2. Caractéristiques physicochimiques des deux huiles :

3.2.4.2.1. Détermination de l'aspect et la couleur à 20°C pendant 24 heures :

➤ Principe : (selon la méthode COI-T20-DOC n°5)

La détermination de l'aspect et la couleur consiste à observer l'aspect d'une huile après 24 heures à une température de 20°C.

➤ Mode opératoire :

- Peser quelques grammes d'huile dans une fiole conique en verre transparent bien nettoyé et séché.
- Laisser la fiole à une température de 20°C à l'abri de la lumière et l'air pendant 24 heures.
- Après ce temps écoulé, noter l'apparence et la couleur en utilisant un arrière-plan blanc.

3.2.4.2.2. La densité relative :

➤ Principe : (Pharmacopée Européenne 1997)

La densité relative d'une substance est le rapport entre la masse d'un certain volume de cette substance à 20°C et la masse d'un volume égale d'eau à la même température.

$$D = \rho_{\text{echant}} / \rho_{\text{eau}}$$

3.2.4.2.3. L'indice de réfraction :

➤ Définition :

L'indice de réfraction noté n_T^D d'une substance est rapport de vitesse de la lumière (à une longueur d'onde définie) dans le vide à sa vitesse dans la substance.

➤ Mode opératoire : (Pharmacopée Européenne 1997)

- Soulever la partie mobile de réfractomètre avec un chiffon doux, puis à l'aide d'un tampon d'ouate mouillé avec quelque goutte d'éthanol.
- Etaler quelques gouttes d'huile à l'aide d'une pipette pasteur sur la plaque du prisme de façon qu'elles emplissent entièrement l'espace entre le prisme.
- Déplacer la lunette dévissée de manière à ce que la ligne de séparation entre les plages sombres et claire soit placée à la croisée des fils du réticule.

Note : le prisme doit être nettoyé avant et après la mise d'huile, il faut veiller à ne pas rayer les plages du prisme au moment d'étaler l'huile par la pipete pasteur.

Pour s'assurer de la fiabilité des résultats et la reproductibilité de l'appareil, il est nécessaire d'étalonner le réfractomètre à l'aide d'un corps de référence d'indice de réfraction connu $n_{20}^D = 1.5163$

➤ Expression des résultats :

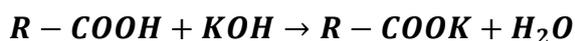
Lire avec précision la valeur indiquée par le refractomètre sur l'échelle à la ligne de séparation à une température de 20°C.

3.2.4.2.4. Indice d'acide :

➤ Définition :

Selon la pharmacopée européenne, l'indice d'acide (I_A) est le nombre qui exprime en milligrammes, la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans un gramme d'huile.

➤ Réaction :



➤ Mode opératoire:

- dissoudre 2.5 ± 0.01 g d'huile, pesée à l'aide d'une balance analytique, dans 50ml d'un mélange à volumes égaux d'alcool et d'éther. Le solvant doit être

neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0.1M en présence de 0.5ml de phénolphaléine.

- après dissolution, titrer par l'hydroxyde de potassium 0.1M. Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste pendant 15 secondes au moins.

➤ Expression des résultats :

L'indice d'acide (I_A) est exprimé selon la formule suivante :

$$I_A = \frac{5.61 \times V}{M}$$

Sachant que :

V : volume de KOH 0.1M consommé.

M : masse de la substance à examiner.

3.2.4.2.5. Indice de saponification :

➤ Définition : (pharmacopée européenne 2001)

L'indice de saponification I_s est le nombre qui exprime en milligramme, la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substances.

➤ Mode opératoire :

- Dans une fiole de 250ml de verre et munie d'un réfrigérant à reflux, introduire la prise d'essai de 2 ± 0.01 g d'huile.

- Ajouter 25ml d'hydroxyde de potassium alcoolique à 0.5M.

- Adapter le réfrigérant et chauffer à reflux pendant 30 min.

- Ajouter 1ml de la solution phénolphaléine et titrer immédiatement (alors que la solution est encore chaude) par l'acide chlorhydrique 0.5M.

- effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions.

➤ Expression des résultats :

$$I_s = 28.05(V_2 - V_1)/M$$

Soit :

V_1 : le volume d'acide chlorhydrique, utilisé pour l'échantillon exprimé en ml.

V_2 : le volume d'acide chlorhydrique, utilisé pour l'essai à blanc.

M : la prise d'essai, exprimée en g.

3.2.4.2.6. L'indice d'ester :

- Définition : (pharmacopée européenne 2001)

L'indice d'ester est le nombre qui exprime en mg la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile.

- Expression des résultats :

Il est calculé à partir de l'indice de saponification et l'indice d'acide selon la formule suivante :

$$I_E = I_S - I_A$$

3.2.4.3. Etude des activités biologiques des huiles végétales :

3.2.4.3.1. Etude de l'activité antioxydante *in vitro* :

- Définition :

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement le rancissement, retarder la peroxydation lipidique, sans effets sur les propriétés sensorielles et nutritionnelles du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit.

En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, et n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirables et résistant aux processus technologiques ; donc stable dans le produit fini [158].

- Principe :

Pour étudier l'activité anti radicalaire de nos fractions lipidiques, nous avons opté pour la méthode qui utilise le diphényl picryl-hydrayl ; DPPH comme un radical libre relativement stable.

Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette, en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrayl, (figure 3.4) dont l'intensité

de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [159].

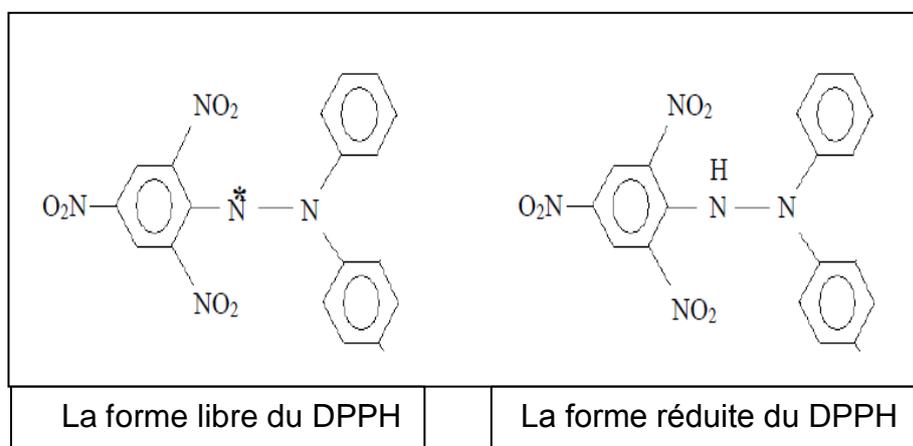


Figure 3.4 : la forme libre et réduite du DPPH [160].

➤ Mode opératoire :

- Préparation de la solution du DPPH:

4±0.001mg de DPPH sont pesés à l'aide d'une balance de précision et dissouts dans 100ml de Méthanol absolu, la préparation est conservée à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

- Préparation des dilutions des HV :

Pour les deux HV que ce soit des graines ou de pulpe, on a préparé des une série de dilutions ; dans du méthanol absolu, à l'ordre de 20, 16, 12, 8 et 4mg/ml.

- Test proprement dit :

Dans des tubes secs stériles, on a introduit :

- 1ml de chaque dilution.
- 2ml de la solution DPPH.
- On laisse incuber pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Pour chaque concentration, le test est réalisé trois fois de suite.
- Pour chaque série, on a préparé un blanc constitué de 1 ml du méthanol absolu et 2ml de la solution DPPH.
- une solution standard de la α Tocophérol (Vitamine E) est préparée en suivant les mêmes étapes et les mêmes conditions opératoires

avec les concentrations suivantes : 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 et 0.006mg/ml.

- La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à la longueur d'onde de 515nm par spectrophotomètre [161].

➤ Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en activité antiradicalaire qui définit la capacité de piéger le radical libre, elle est estimée par le pourcentage(%) de décoloration du DPPH, elle se calcule selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{DO}_{\text{Control}} - \text{DO}_{\text{échantillon}}}{\text{DO}_{\text{Control}}} \times 100$$

Les résultats ont été exprimés par la moyenne des trois mesures \pm écart type.

Le paramètre l'EC₅₀ appelé aussi l'IC₅₀, est déterminé pour chaque HV. Elle est définie comme étant la concentration de substrat qui cause la perte de l'activité du DPPH de 50% [162, 163].

Les résultats de la IC₅₀ moyenne ont été calculée par les courbes de régressions linéaires $y = ax + b$, ou $y = 50\%$.

3.2.4.3.2. Etude de l'activité antimicrobienne *in vitro* :

Il existe plusieurs méthodes employées pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes classées selon la nature du contact de l'extrait avec le germe (Aromatogramme, Micro-atmosphère, méthode de dilution à partir des disques, méthode des puits ainsi que les méthodes sur milieu liquide ...etc.), mais dans notre étude nous avons choisi l'aromatogramme (test qualitatif) suivi par la méthode de dilution (test quantitatif).

3.2.4.3.2.1. L'aromatogramme : (test qualitatif)

La méthode de diffusion sur gélose appelée aromatogramme est l'équivalent de l'antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par d'autres extraits, les huiles végétales dans notre cas.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier Wattman sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile.

Cette méthode utilisée par certains auteurs [164, 165, 166, 167] est la technique que nous avons utilisée.

La technique d'aromatogramme s'effectue selon les étapes suivantes :

Préparation du milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé est gélose Muller-Hinton, qui doit être fondue et coulée en boîte de Pétri sur une épaisseur de 4 mm et puis laissée se solidifier.

Les géloses doivent être séchées avant l'emploi pour éliminer toute trace d'humidité qui favorise.

Préparation de l'inoculum

- A partir du milieu de conservation contenant la souche conservée à +4°C et à l'aide d'une pipette Pasteur, ensemer une boîte Pétri contenant une gélose nutritive puis incubé (24h, 37°C).
- A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement et à l'aide d'une anse de platine, racler quelques colonies identiques.
- Préparer une suspension bactérienne en déchargeant l'anse de platine dans l'eau physiologique stérile 0.9%, homogénéiser (vortex).

Ensemencement

A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever environ 0.1ml de la suspension bactérienne, l'étaler sur toute la surface de la gélose à l'aide d'une pipette râteau.

Application des disques

Des disques de papier Wattman n°3 de 6 mm de diamètre sont stérilisés précédemment à la chaleur humide.

Après les avoir imprégnés par les deux HV, déposer ces derniers sur la gélose déjà ensemencée par l'inoculum avec une répétition ; chaque boîte doit contenir trois disques du même produit antibactérien testé.

Incubation :

Incuber les boites à 35-37°C pendant 18-24 heures.

Lecture

À l'aide d'un pied à coulisse métallique (ou d'une règle), on mesure les diamètres des zones d'inhibition (zone circulaire stérile autour du disque) (figure 3.5), et puis on calcule la moyenne des diamètres d'inhibition de chaque trois disques identiques (répétitions), et en se basant sur cette moyenne, la souche étudiée est alors classée (tableau 3.4).

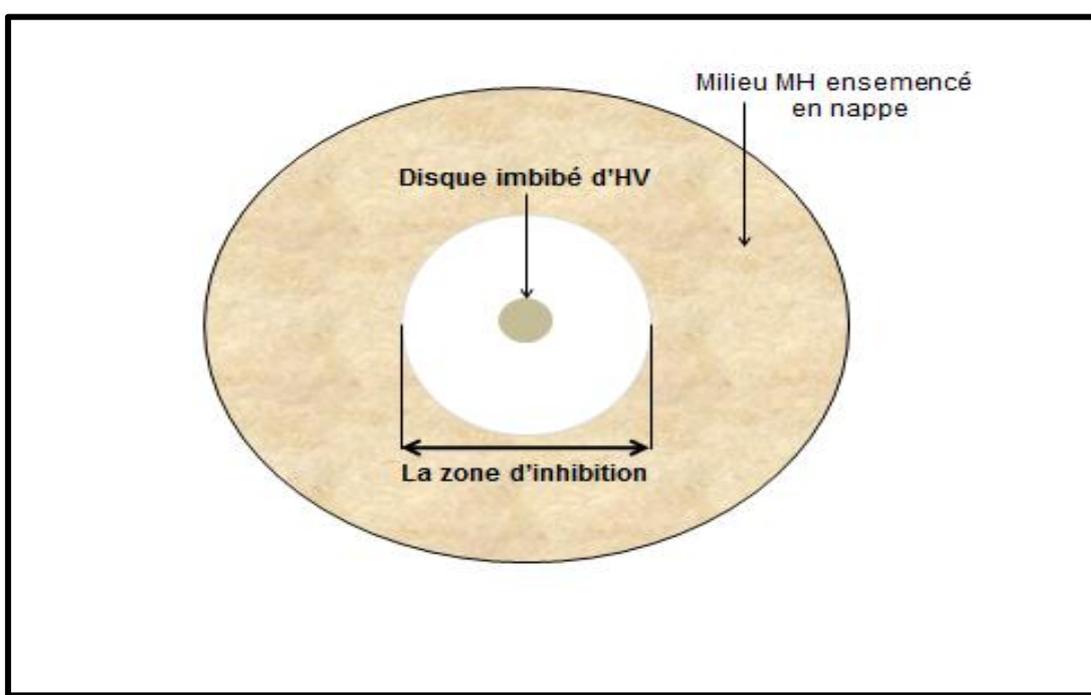


Figure 3. 5 : Illustration de la technique d'aromatogramme utilisée (Original 2014)

Tableau 3. 4 : Transcription des diamètres des zones d'inhibition.

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Sensibilité du germe
<9	Résistant
9-14	sensible
15-19	Assez sensible
>20	Très sensible

3.2.4.3.2.2. Techniques à base de dilutions : (test quantitatif)

Cette méthode consiste à mettre en évidence l'activité antimicrobienne de l'HV après une série de dilutions, en mettant cette dernière en présence des germes. C'est une variante de l'aromatogramme en imprégnant le disque avec les différentes dilutions en HV [168].

La préparation des dilutions a été réalisée selon les étapes suivantes : [146]

- D'abord, une solution de Tween 80 (2%) est préparée à base de l'eau physiologique stérile.
- A base de cette solution, une série de dilution est préparée pour les différentes HV utilisées. Dans notre étude nous avons préparé trois dilutions de chacune des huiles végétales. (50%, 25% et 12.5%) comme suite :
 - 0.5 ml de l'HV est introduite aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile dans un tube stérile contenant 0.5 ml de Tween 80 (2%). Cette suspension constitue la dilution mère (DM) qui correspond donc à la dilution 1/2 ou 50%.
 - Le tube contenant la DM doit être agité pour homogénéiser les deux phases du milieu.
 - Ensuite, 0.5 ml de la DM est introduite aseptiquement, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, dans un tube stérile contenant 0.5 ml du même diluant. Cette dilution nouvellement obtenue correspond à la dilution 1/4 ou 25 % (D2).
 - 0,5 ml de la dilution D2 est dilué dans 0.5ml de Tween 80 (2%) dans un troisième tube stérile, ce qui donne une dilution 1/8 ou 12.5% (D3).

Nous avons répété cette procédure avec les deux HV.

Pour réaliser le témoin positif on a utilisé des disques d'antibiotiques qui seront mentionnés dans le prochain chapitre.

- Dépôt des disques :

Les différentes dilutions obtenues seront imprégnées sur des disques de papier Wattman qui seront déposés à la surface d'un milieu gélosé (MH) préalablement ensemencé avec la suspension bactérienne.

- Lecture :

Elle se fait de la même manière que celle d'aromatogramme.

3.2.4.3.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI » (test quantitatif) :

Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en huile capable d'inhiber la croissance bactérienne.

3.2.4.3.2.4. Test de contrôle :

C'est un test qui sert à contrôler la fiabilité du matériel utilisé tels que les disques et le Tween 80 en les utilisant comme témoins lors de la manipulation.

3.2.5. Analyse statistique:

L'ensemble des résultats obtenus des différents paramètres testés ont fait l'objet d'un traitement statistique d'analyse de variance à un seul facteur (ANOVA) type GLM (General Linear Model).

CHAPITRE 4 :

RESULTATS ET DISCUSSION

Le présent travail avait comme premier volet la quantification des métabolites primaires de nos échantillons de pulpe et de graines de caroubes. Puis cette étude s'est étendue vers l'extraction d'huile végétale par solvant à partir de ces deux matrices.

Cette fraction lipidique a été identifiée par CG/SM en premier temps. Ensuite, caractérisée sur le plan physicochimique. En dernier, une étude de ces activités biologiques a été menée.

Les résultats que nous avons obtenus sont représentés ci-dessous :

4.1. Résultats de la détermination de la composition chimique de *C siliqua L* :

4.1.1. Teneur en eau :

Les résultats obtenus après la dessiccation de la poudre de caroube et celle des graines sont représentés par la figure 4.1 et répertoriés dans le tableau de l'appendice E.

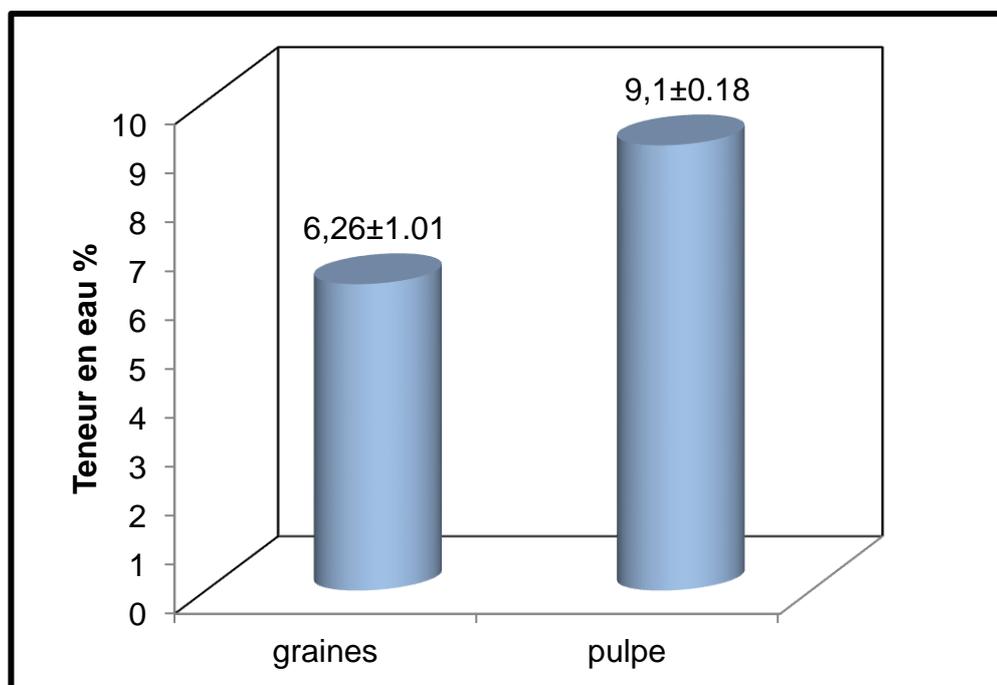


Figure 4.1 : Teneur en eau de la pulpe et des graines de caroube.

La détermination du taux d'humidité permet d'exprimer les résultats obtenus en fonction de la matière sèche.

Comme le montre la figure 6.1, la teneur en eau des graines de caroubes est inférieure à celle de la pulpe conformément à la bibliographie. La différence entre les deux valeurs est hautement significative avec une probabilité $P=0.009$. (Appendice F)

D'après la même figure 6.1, la moyenne de la teneur en humidité de notre première matrice (les graines) est de $6.26\% \pm 1.01$. Selon **Alvarez-Fuentes et al. (2012)** une valeur de 8.2% a été signalée [12].

Les résultats de la deuxième matrice étudiée (pulpe) de $9.1\% \pm 0.18$, sont comparables à ceux de **Khlifa et al. (2013)**, et de **Vekiari et al. (2011)** de l'ordre de 10.2 et 10.9% respectivement [14, 169]. Or, d'autres pulpes de Liban sont plus humides et présentent des valeurs un peu plus élevées et qui varient entre 13.54% et 17.05%, selon les travaux de **Haddarah et al. (2013)** [3]. Dans une autre étude menée sur des caroubes de l'Egypte, **Kamal et al. (2013)** ont trouvé des valeurs plus faibles (5.29%) [21].

Ces différences sont probablement dues à l'origine géographique, les conditions climatiques, les procédures et la période de récolte et de stockage ainsi que les méthodes d'analyses [4, 74, 79, 80, 81].

4.1.2. Teneur en cendres :

Après calcination de nos échantillons, nous avons obtenu les résultats illustrés par la figure 4.2 et regroupés dans l'appendice E.

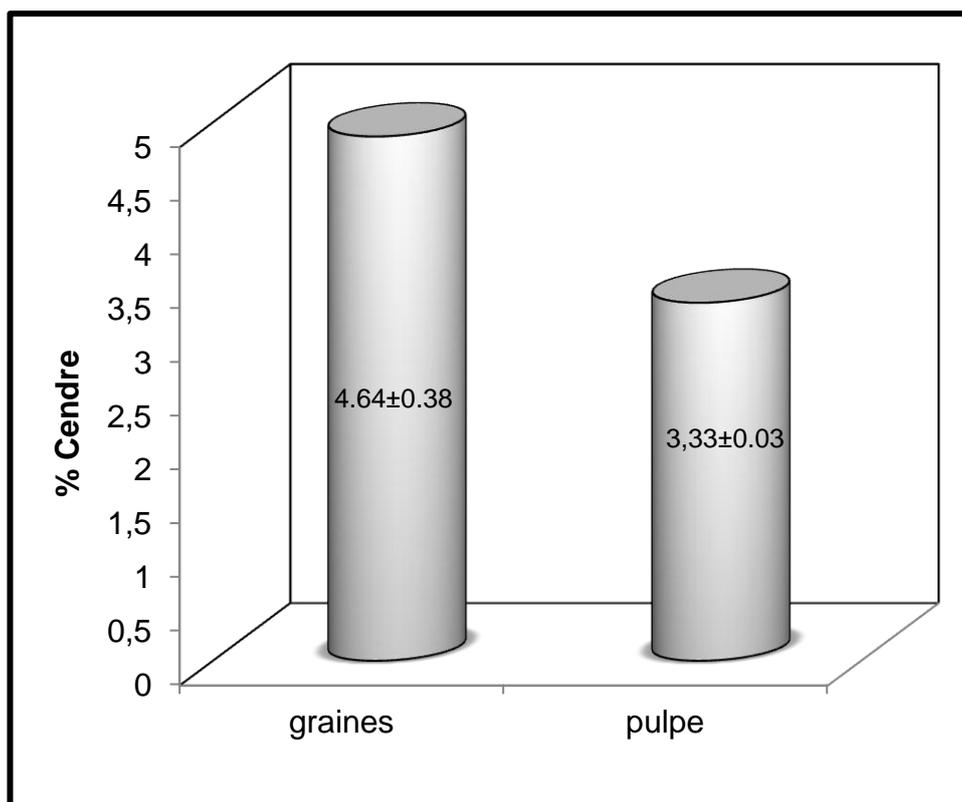


Figure 4.2: Teneur en cendre de la pulpe et des graines de caroube.

La teneur en cendres représente la quantité totale des sels minéraux présents dans l'échantillon analysé.

La figure 4.2 montre clairement que les graines contiennent plus de minéraux que la pulpe. Une différence hautement significative est signalée dans ce cas ($P=0.004 < 1\%$). (Appendice F)

D'après la figure ci-dessus, les minéraux des graines représentent une moyenne de $4.64\% \pm 0.38$. Cette valeur se rapproche à celle trouvée par **Alvarez-Fuentes et al. (2012)** [12] qui est de 4.1% et de **Bouzouita et al.** [90]

Il ressort de la figure 4.2 que le taux de cendre de la pulpe est de $3.33\% \pm 0.03$. Cette valeur est en concordance avec celles trouvées par **Youssef et al. (2013)** [21], **Khelifa et al. (2013)** [14] et **Haddarah et al. (2013)** [3] qui sont de l'ordre de 3.16%, 3% et jusqu'à 3.36% respectivement. Mais ces valeurs peuvent être totalement différentes dans des échantillons de provenances géographiques différentes, notamment les conditions climatiques et les caractères édaphiques des sols.

D'après **Kamal et al. (2013)**, les différents minéraux se trouvant dans la pulpe de caroube qui sont en quantité dominante sont le potassium, phosphore et calcium avec 8637.64 mg/kg; 2255.21mg/kg, 2123.00mg/kg. D'autres éléments sont présents en traces [21].

De plus, la proportion inégale au niveau de la pulpe et de la graine dépend de l'activité biologique des deux parties de la plante [170].

4.1.3. Dosage des protéines brutes :

Le dosage des protéines est l'un des critères utilisés pour évaluer la valeur nutritive d'un aliment.

Le dosage du nitrogène pour les deux matrices, effectué par la méthode Kjeldahl, multiplié par le facteur 6.25 nous a donné les résultats enregistrés dans la figure 4.3.

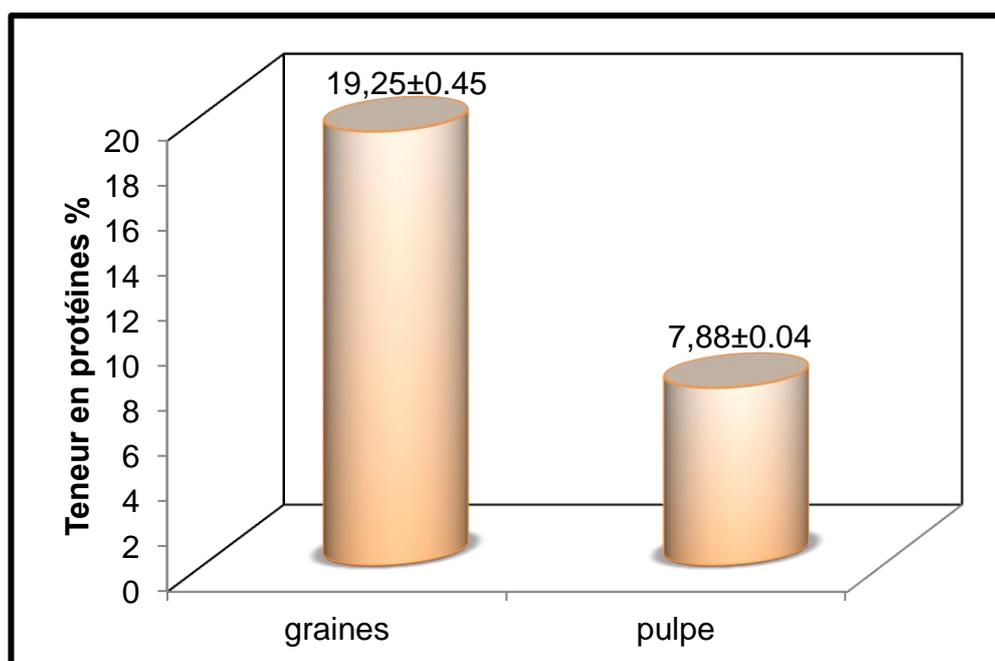


Figure 4.3 : Teneur en protéines brutes de la pulpe et des graines de caroube.

Ce qui ressort essentiellement des résultats illustrés dans la figure ci-dessus est que l'évaluation du taux des protéines révèle des quantités appréciables pour les deux composantes de la caroube. On remarque notamment que les graines sont d'autant plus riches en ces composés que la pulpe. La différence entre les deux moyennes est très hautement significatives ($P=0.000 < 0.1\%$).

Le taux de protéine de la pulpe de l'ordre de $7.88\% \pm 0.04$ se rapproche de celui obtenu par **Kamal et al. (2013)**, qui ont trouvé une valeur de 6.43% [21].

Or, d'autres auteurs comme **Khlifa et al. (2013)**, **Vekiari et al. (2011)** et **Haddarah et al. (2013)**, ont trouvé des valeurs plus inférieures : 2.74%, de 3.6 jusqu'à 4.8%, et 3.61 jusqu'à 5.62% respectivement [14, 169, 3]. La teneur en protéines dépend sans aucun doute des conditions pédoclimatiques ainsi que le stade de développement de la plante [169].

Sur cette même fraction protéique, d'autres travaux ont été réalisés afin de déterminer sa composition en acides aminés et ils ont prouvé qu'elle varie d'un fruit à l'autre suivant l'espèce, l'origine géographique, le stade de maturation et la méthode de culture. **Ayaz et al. (2007)**, [98] trouvaient que la pulpe de caroube contenait 18 acides aminés représentés en majeure partie par l'acide aspartique suivi de l'alanine, l'acide glutamique, la leucine, la valine et l'arginine ; la cystéine et le tryptophane sont les acides aminés qui ont montré les plus faibles concentrations.

Une étude complémentaire s'est poursuivie ultérieurement pour comparer ces derniers résultats avec le taux standard des protéines selon l'organisation mondiale de la santé (OMS). **Ayaz et al. (2009)** ont tiré conclusion que cette pulpe contient un taux d'acides aminés essentiels bien raisonnable à l'exception de la lysine [171].

Concernant notre deuxième matrice (graines), elle contient une quantité de protéines appréciable, déjà plus élevée par rapport à la pulpe, comme montre la figure 4.3. Les travaux menés par **Alvarez-Fuentes et al. (2012)**, ont rapporté des valeurs comparables (18.4%). Ces derniers ont étudié la composition des graines en acides aminés et ont montré qu'elles renferment 5.9% de lysine, 1.3% d'arginine, 1.4% de cystéine, 1% de tryptophane et 0.7% de méthionine [12]. **Dakia et al. (2007)** ont poussé plus loin leur investigation, pour déterminer la qualité nutritionnelle des protéines de germe en les comparant avec les normes standard de la FAO et prouvaient qu'elles renferment des acides aminés essentiels en quantités satisfaisantes, à l'exception de tryptophane qui a présenté les plus faibles concentrations [13].

4.1.4. Dosage des sucres totaux :

Les résultats du dosage des sucres totaux des graines et de la pulpe sont représentés dans la figure 4.4.

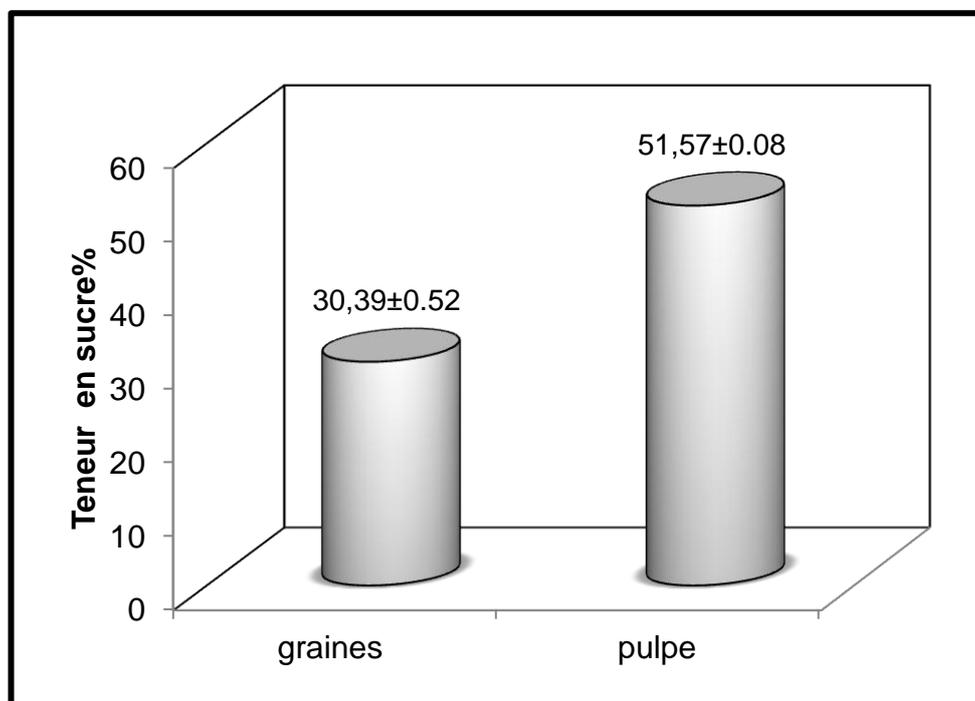


Figure 4.4: Teneurs en sucres totaux des pulpe et graines.

D'après la figure 4.4, on remarque que la pulpe est très riche en sucres. Elle peut contenir jusqu'à $51.57g \pm 0.08$ par rapport à 100g de matière sèche. Cette valeur concorde celles dictées par la littérature. **El Battal et al. (2011)** ont trouvés des valeurs jusqu'à 50.1% [15]. De même, **Santos et al. (2005)** [85], **Bernardo-Gil et al. (2011)** [84] et **Battle et Tous. (1997)** [4] ont obtenu des moyennes entre 48 et 57%. Alors que des valeurs atteignent 89.46% selon les travaux menés par **Haddarh et al. (2013)** [3], pour la caroube de la Jordanie. La caroube d'Espagne contient un taux de sucre de 46.95% selon **Albanell et al. (1991)** [172].

On remarque donc que la localisation géographique affecte le taux de sucres. En outre, les études de **Khelifa et al. (2013)** ont montré que ces sucres sont représentés majoritairement par le saccharose, fructose et glucose avec des moyennes de 44.64%, 7.18% et 2.2% respectivement [14]. **Biner et al. (2007)** et **Battle et tous. (1997)** ont rapporté presque les mêmes résultats [74, 4].

Toutes ces valeurs nous amènent à conclure que la pulpe est très riche en sucre, ce qui lui vaut sa saveur sucrée. C'est pour cette raison qu'elle est utilisée comme substituant de chocolat sucré naturellement, ingrédient en biscuiterie et pâtisserie,... Aussi, l'utilisation de ce fruit comme source de sucre, aura un grand intérêt économique de part de son prix, ainsi que sa teneur plus élevée que la canne à sucre et la betterave sucrière.

D'une autre part et en la comparant avec la pulpe, les graines de la caroube contiennent moins de sucre ($30.39\% \pm 0.52$). Cette différence est très hautement significative avec une probabilité $P=0.000 < 0.1\%$.

Cette valeur que nous avons obtenue est un peu plus élevée par rapport à celle trouvée par **Dakia et al. (2007)** [13]. Plus tard, **Dakia et al. (2008)** ont évalué la composition en sucres ; elle est représentée par le mannose, le galactose, le glucose, l'arabinose, le xylose et le rhamnose [173].

4.1.5. Fractionnement et dosage des polysides pariétaux :

Afin de doser tous les composés poly osidiques constituant la paroi végétale des graines et de la pulpe des fruits de *Ceratonia siliqua* L. nous avons opté comme méthode d'analyse celle de **Van Soet** décrite précédemment. Les résultats qu'on a obtenus rapportés à la matière sèche sont indiqués dans la figure 4.5.

Il est à noter que l'hémicellulose insoluble, la cellulose ainsi que la lignine sont les trois composés de la fraction fibres insolubles, et se sont regroupés dans l'appendice G.

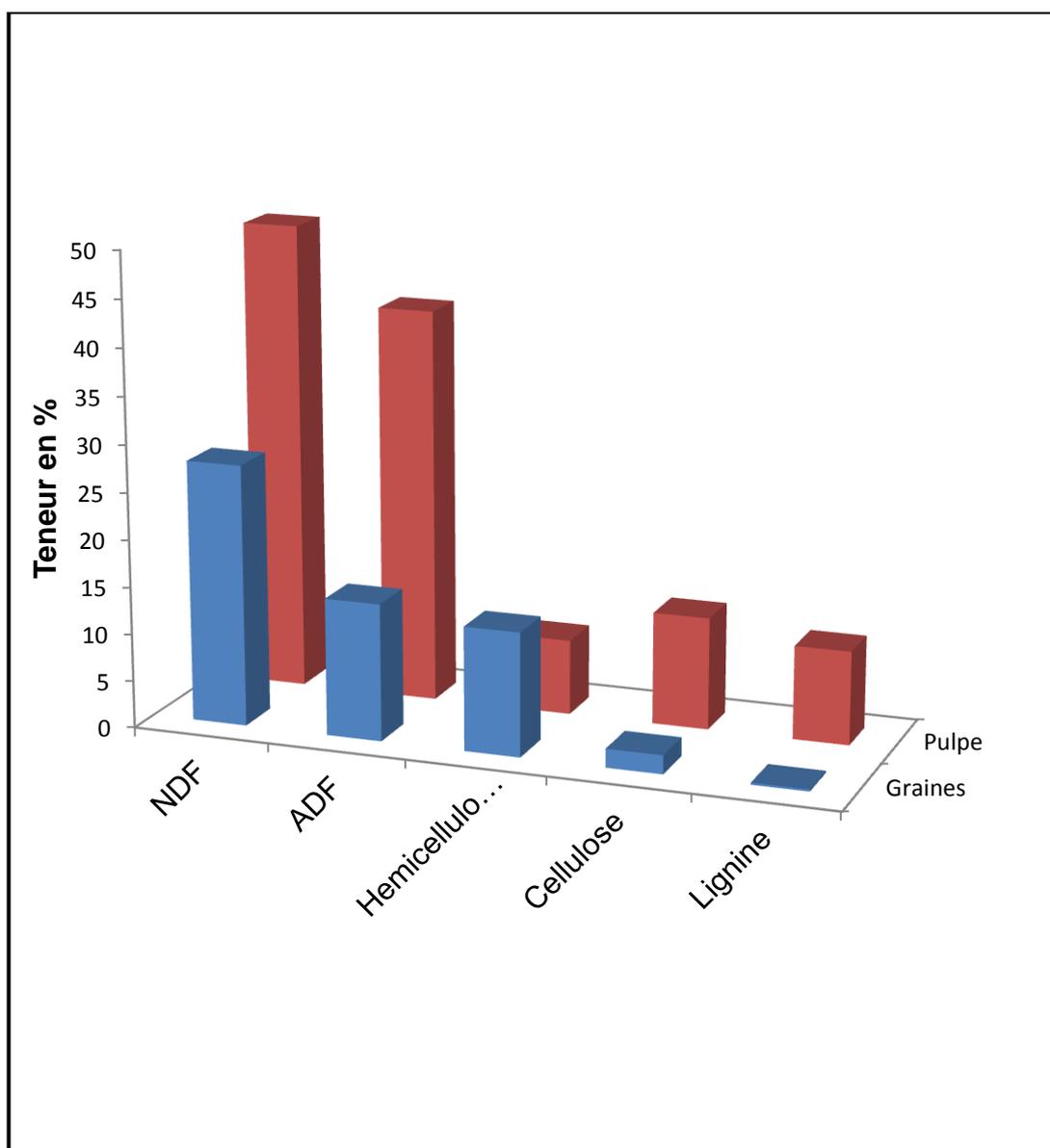


Figure 4.5 : Les différents constituants de la paroi végétale des graines et pulpe de la caroube.

D'après les résultats indiqués dans l'appendice F et la figure 4.5, les valeurs d'NDF obtenues de la pulpe et celles des graines sont de l'ordre de $49,7\% \pm 0,87$ et $27,68\% \pm 1,19$ respectivement avec une différence très hautement significative ($P=0,000$). De même pour l'ADF, on a signalé des valeurs de $41,74\% \pm 0,14$ pour la pulpe et $14,54\% \pm 0,17$ pour les graines. La différence entre ces deux dernières valeurs étant très hautement significative ($P < 0,1\%$).

Ainsi, la pulpe de la caroube comporte moins d'hémicellulose par rapport aux graines ($7,96\% \pm 1,03$ et $13,14\% \pm 0,81$). Une différence hautement significative a été noté ($P=0,004$).

Or, l'analyse statistique montre une différence très hautement significative ($P=0.000$) entre les valeurs de cellulose et de lignine des graines et pulpe. On remarque aussi que la pulpe renferme plus de fibres insolubles (29.82%) que les graines (15.34%).

La figure 4.5 montre que pour la pulpe, la cellulose est la fraction dominante ($11.92\% \pm 0.44$), suivie par la lignine et l'hémicellulose respectivement, ($9.94\% \pm 0.2$ et $7.96\% \pm 1.03$). De même, il a été confirmé que la pulpe comporte aux environs de 18% de cellulose et d'hémicellulose [36], ce qui est le cas pour notre échantillon.

Plusieurs auteurs affirment que la pulpe contient une quantité appréciable en fibre qui varie de 4.2 jusqu'à 39.8% et cela dépend de la méthode d'extraction [16, 17]. Les teneurs en fibres trouvées par plusieurs auteurs sont variables : 7.74% [3], 7.30% [174], 6.9% [14].

Par contre, pour les graines, la fraction la plus prépondéralement contenue est représentée en majeure partie par l'hémicellulose ($13,14\% \pm 0.81$). Le seul travail effectué en suivant la même méthode que nous avons opté est celui d'**Alvarez-Fuentes et al. (2012)** [12] qui ont obtenu comme résultats des taux de NDF de 42% et 15.6% d'ADF. Dans ce présent travail, nous avons eu des résultats comparables concernant l'ADF (14.54%). Alors que nous avons signalé des résultats plus inférieurs pour le NDF (27.68%).

4.1.6. Teneurs en matière grasse :

Après six heures d'extraction continue, avec un solvant approprié (éther de pétrole), le rendement en huile enregistré est illustré dans la figure 4. 6.

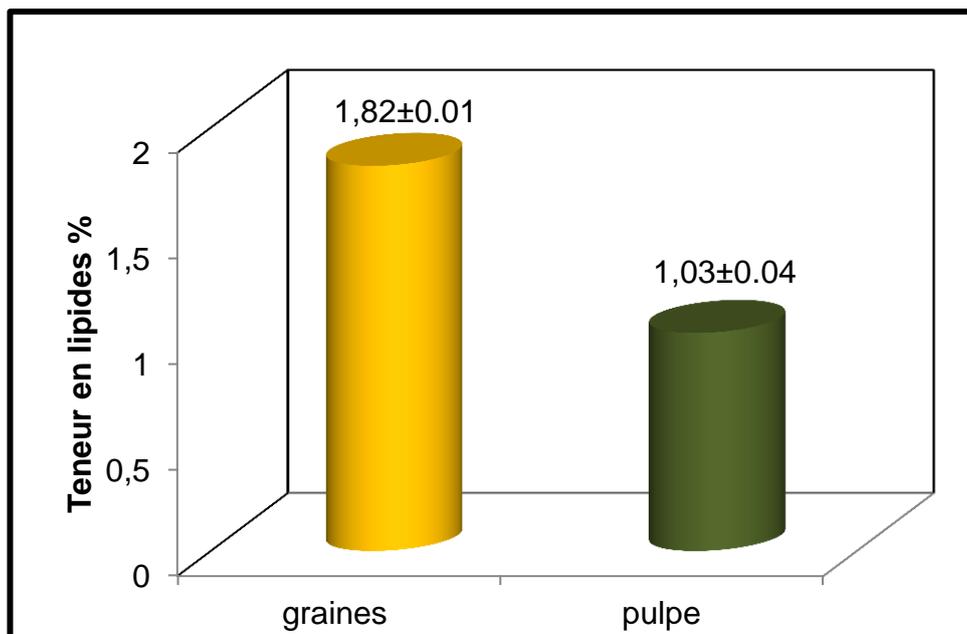


Figure 4.6: Taux de matière grasse des graines et pulpe.

D'après les résultats cités dans la littérature, il est clairement rapporté que les composantes de la caroube (graines et pulpe) renferment peu d'huile [14, 21, 146, 152].

La figure ci-dessus montre que la pulpe renferme très peu d'huile (1.03%±0.04) par rapport aux graines (1.82%±0.01). L'outil statistique révèle une très haute significativité entre ces deux valeurs ($P < 0.1\%$).

Les résultats obtenus dans ce travail sont presque similaires aux autres résultats cités. Toujours par rapport à la matière sèche, on a eu 1.03% d'huile pour la pulpe. Cette valeur concorde ceux de **Khelifa et al. (2013)** [14], qui sont de $1.15 \pm 0.07\%$. **Youssef et al. (2013)** [21], ont eu des résultats un peu plus supérieurs (1.99%).

Du même graphique, il ressort que le rendement d'huile des graines est de 1.82%. Ce taux est comparable avec celui dicté par de nombreux auteurs. De 1.73% jusqu'à 1.84% pour les travaux de **Matthaus et Özcan. (2011)** [152].

Fadel et al. (2011) ont rapporté une valeur de 2.1% [146]. Cette différence serait liée à de nombreux facteurs ; méthode d'extraction, cultivar, localisation géographique, nature du sol, etc. **Dakia et al. (2007)** ont trouvé des valeurs très distantes (de 6.6 jusqu'à 8.2%) car le dosage a été fait sur le germe pur [13].

Le même graphique illustre que les graines de caroube contiennent plus de matière grasse par rapport à l'autre matrice. C'est tout à fait normal comme la graine est un organe utilisé par la plante pour le stockage des nutriments [4].

4.2. Analyse des huiles de caroube par CG/SM :

Nos échantillons d'huile (transesterifiés) ont été analysés par CGMS au niveau de l'Unité de Recherche et de Développement (URD), à DAR ELBEIDHA. C'est une technique très utilisée pour l'analyse quantitative et qualitative des composés volatiles ou qui sont rendus volatiles.

Après injection de nos échantillons, on a eu les chromatogrammes représentés dans les figures 4. 7 et 4. 8.

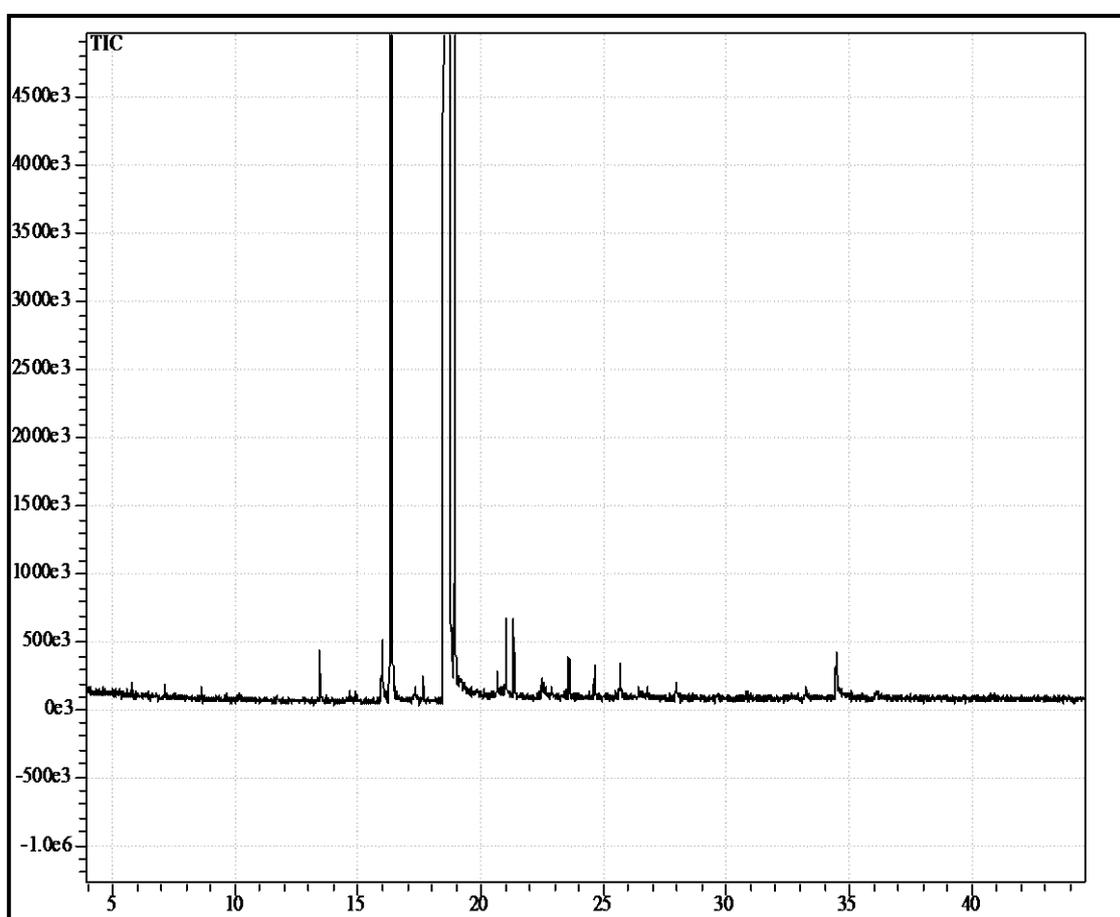


Figure 4.7 : Chromatogramme de l'huile des graines de caroube.

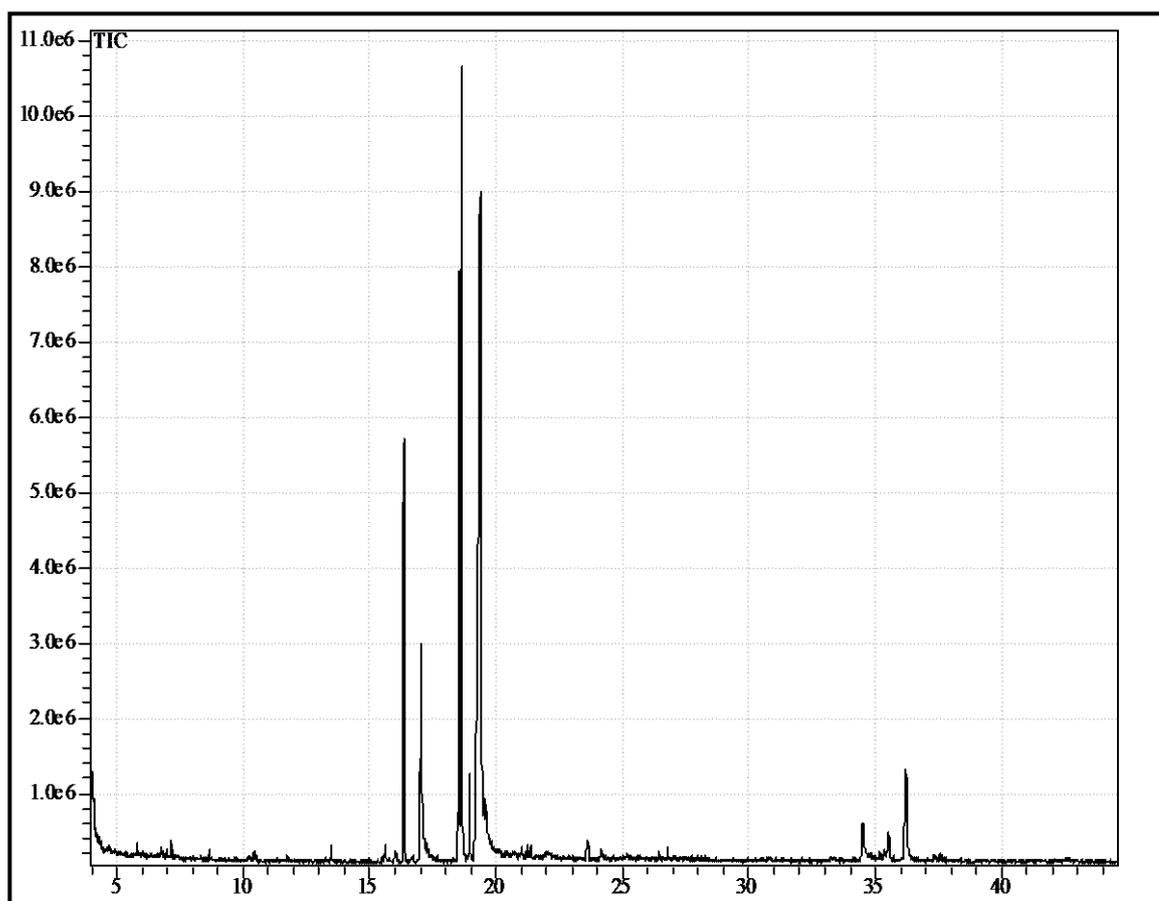


Figure 4.8 : Chromatogramme de l'huile de pulpe de caroube.

Les résultats de l'identification qualitative et quantitative des composés chimiques par CG/SM sont représentés dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Profil et composition en acides gras des huiles de graines et de pulpe de caroube.

	Ecriture symbolique	%AG (HVg)	%AG (HVp)
Acide Butyrique	C 4	0.2	0.46
Acide Caproïque	C 6	-	1.71
Acide Caprylique	C 8	-	0.25
Acide Caprique	C 10	-	8.04
Acide Myristique	C 14	10.43	8.40
Acide Cyclopentanondécanoïque	C 15	0.18	0.21
Acide Arachidique	C 20	0.14	-
Acide 4-octénoïque	C 8 : 1 (4)	1.79	-
Acide Oléique	C 18 : 1(9)	40.58	15.92
Acide Vaccénique	C 18 : 1 (11)	0.13	-
Acide Linoléique	C 18 : 2 (9, 12)	45.61	43.09
Acide Linoléique	C 18 : 3 (9, 12, 15)	-	2.14
Acide 9,15 octadécadiénoïque	C 18 : 2 (9, 15)	-	11.44
Total inconnu		0.94	8.34
Total des « AGS »		10.95	19.07
Total des AGIS »		88.11	72.59
AGS/AGIS		0.12	0.26

Les résultats obtenus montrent que 16 composés rentrent dans la composition de l'huile des graines. Les acides gras les plus prépondéralement détectés sont l'acide linoléique, oléique et l'acide myristique avec des pourcentages de l'ordre de 45.61%, 40.58% et 10.43%. Les valeurs des deux premiers acides sont proches à celles de **Maza et al. (1989)** et **Dakia et al. 2007** [175, 13]. Aussi **Fadel et al. (2011)** ont obtenu des valeurs similaires, 45.0% et 33.7% [146]. Les spectres de masses de l'acide oléique et linoléique sont représentés dans l'appendice H.

Or **Matthaus et Özcan. (2011)** n'ont pas détecté l'acide myristique, mais des valeurs proches concernant l'acide oléique et linoléique de 26.5 jusqu'à 30.4% et de 49.1 jusqu'à 51% respectivement [152]. Une autre étude effectuée par **Tlili et al.** rapporte que cette huile peut contenir jusqu'à 32.49% d'acide oléique, et jusqu'à 45.43% l'acide linoléique [176]. **Alvarez-Fuentes et al. (2012)** ont eu des résultats comparables à ceux de ces derniers auteurs [12].

En plus, notre huile des graines est très riche en acides gras insaturés. Un taux aux environs de 88.11% est un peu supérieur à celui rapporté par **Fadel et al. (2011)** (80.53%) [146].

A la lumière de tout ça, on peut conclure que les graines de caroube contiennent un taux très élevé d'acides gras insaturés ; jusqu'à 88.11%. Cette valeur rejoint celle de **Fadel et al. (2011)**. Par conséquent, elle doit être conservée à des températures très basses et à l'abri de la lumière pour éviter toutes réactions de peroxydation [146].

En plus, les travaux menés par **Matthaus et Özcan. (2011)** [152] ont démontrés que l'huile des graines de caroube contient une quantité appréciable de tocophérol (vitamine E) avec une valeur de 208.45 jusqu'à 223.14mg/100g d'huile. C'est un antioxydant naturel très puissant et sa présence dans les graines est souvent liée à l'abondance des acides gras insaturés. **Bada et al. (2004)**[177], limitant ainsi les risques de peroxydation [178].

Pour la pulpe, d'après le tableau 4.1 et la figure 4.8, il a été détecté 17 composés dont les principaux sont l'acide linoléique, oléique, l'acide 9, 15 octadécadiénoïque, myristique, caprique et l'acide linoléique. Le spectre de masse de l'acide oléique est présenté dans l'appendice I. Un taux d'acide linoléique de

2.14% concorde celui de **Youssef et al. (2013)**. Mais concernant les autres AG nous avons des résultats totalement différents. Par contre nous avons enregistré un total d'AGI qui corrobore à celui des derniers auteurs [21].

Par la suite, de quelques données du tableau 4.1, on a fait ressortir la figure 4.9

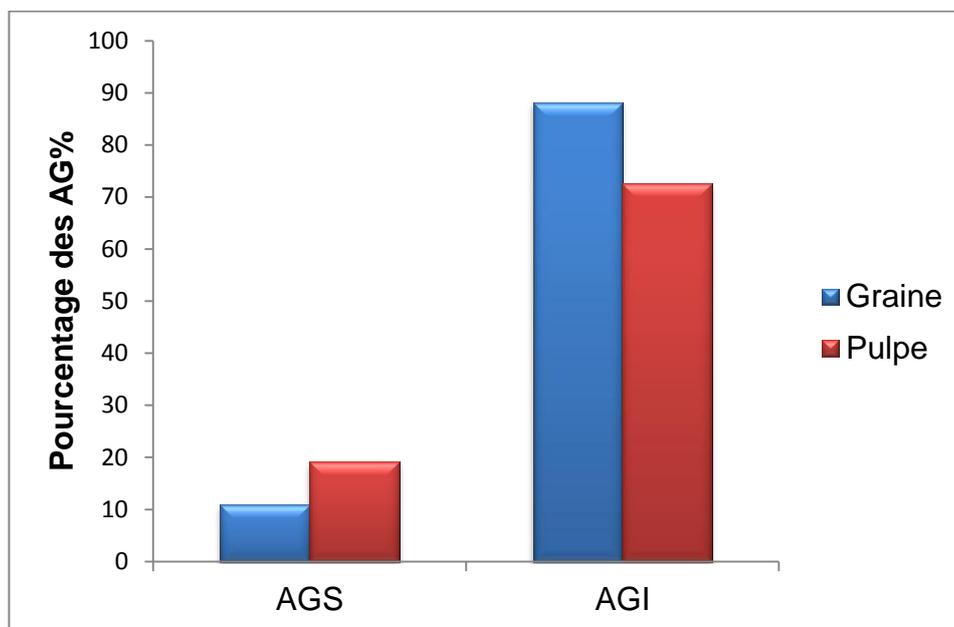


Figure 4. 9 : Le total des acides gras saturés et insaturés des huiles de graines et de pulpe.

Ce qui ressort essentiellement de la figure est que les deux fractions lipidiques que ce soit des graines ou de pulpe renferment plus d'acides gras insaturés par rapport aux acides gras saturés. L'analyse statistique montre que la différence entre les valeurs des AGS des graines et de pulpe est non significative ($P=0.11$). De même pour les AGI, la différence est non significative ($P=0.94$).

A la base de tous ces résultats, on peut tirer trois conclusions :

- Le taux des acides gras insaturés que ce soit dans la pulpe ou dans les graines, est très élevé, conférant à la caroube une propriété très importante, notamment contre les maladies cardiovasculaires.
- La composition en acides gras d'une huile de la même espèce diffère d'une région à une autre selon des facteurs surtout édaphoclimatiques, sans oublier le facteur cultivar.

- En outre, et au sein de la même espèce, et dans les mêmes conditions climatiques, plusieurs plantes montrent une composition différente des lipides dans ses différentes parties [179].

A la lumière de tous ces résultats, on peut dire que la composition chimique de la caroube dépend de la provenance géographique, les conditions climatiques, période de récolte, procédures de conservation, partie de la plante utilisée et des méthodes d'analyses [4, 179].

4.3. Caractérisation physicochimique des huiles :

4.3.1. Détermination de l'aspect et la couleur à 20°C pendant 24 heures :

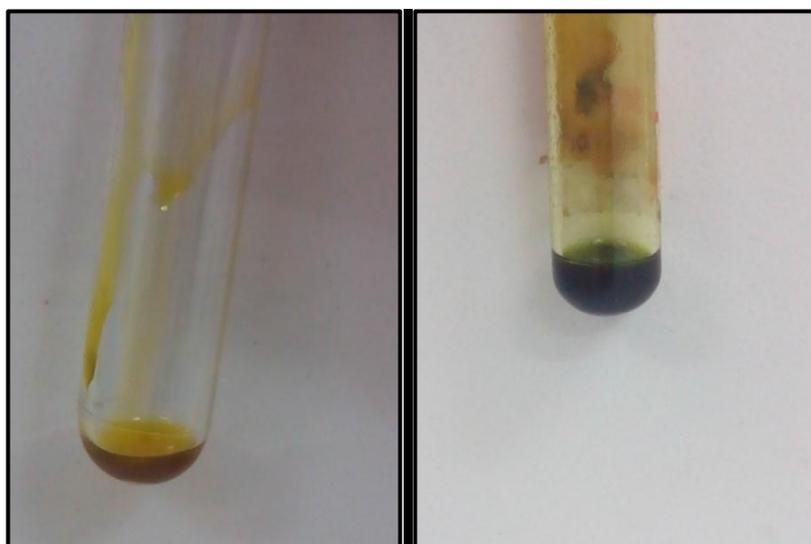


Figure 4. 10 : A droite : huile de pulpe. A gauche : huile des graines.

Tableau 4.2 : Aspect et couleur des huiles.

	Huile des graines	Huile de pulpe
Aspect	Liquide	Liquide
Couleur	Jaune doré	Vert foncé

4.3.2. Caractéristiques physicochimiques des huiles de caroube:

Pour les HV de la caroube, nous n'avons pas trouvé d'étude sur la caractérisation physicochimique de ces huiles. Les résultats obtenus dans notre étude sont mentionnés dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Caractéristiques physicochimiques des huiles de caroube

	Huile des graines	Huile de pulpe
D	0.86	0.81
n_T^D	1.472	1.446
I_A	0.69	0.51
I_s	169.14	177.09
I_E	168.45	176.58

La densité constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une H.V dans différents domaines (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, chimie, etc.). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité du produit ainsi que les tentatives de fraudes et d'adultération. Dans le cas de la caroube, nous avons signalé une valeur de 0.86 pour l'HV des graines qui est un peu supérieure à celle de l'HV de pulpe (0.81) comme montre le tableau 4.3.

Pour l'HV des graines, un indice de réfraction de l'ordre de 1.472 et un indice d'acide de 0.69 sont supérieurs à ceux de la pulpe qui sont 1.446 et 0.51 respectivement.

Par contre, l'HV de la pulpe possède des indices de saponification et d'ester de l'ordre de 179.09 et 176.58 et qui sont supérieurs à ceux des HV des graines.

4.4. Activités biologiques :

4.4.1. Résultats de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir piégeur du DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl) selon la méthode décrite précédemment.

Le DPPH est un radical libre très stable et très utilisé pour évaluer la capacité anti radicalaire de divers échantillons. Cette activité a été évaluée par spectrophotométrie à une longueur d'onde caractéristique de 515nm. En présence d'antioxydants donneurs d'hydrogène au DPPH, l'absorbance diminue. Cette réduction s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune [162] (Appendice J). Ces antioxydants jouent un rôle majeur dans la stabilité des HV.

A des fins comparatives, l'inhibition du DPPH par la vitamine E (la α tocophérol) a été également analysée.

Puis, on a déterminé les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour la vitamine E et pour les deux extraits lipidiques (Pourcentage d'inhibition, l'index IC50, et l'efficacité antiradicalaire).

Dans un premier temps, nous avons tracé les courbes du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits. Les résultats qu'on a obtenus sont représentés dans les figures 4.11 et 4.12 et 4. 13.

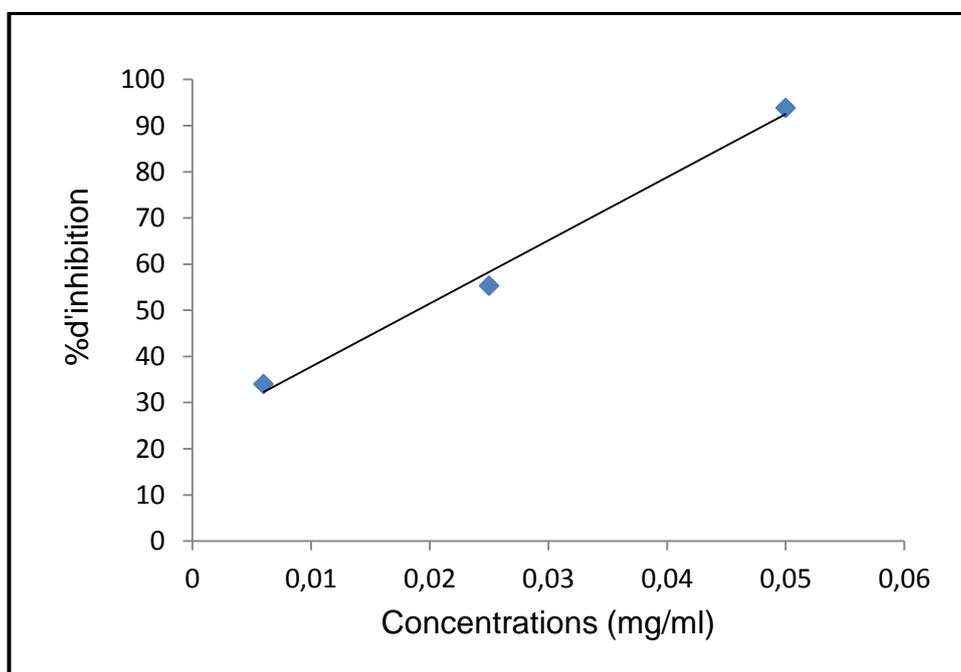


Figure 4.11 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en vitamine E.

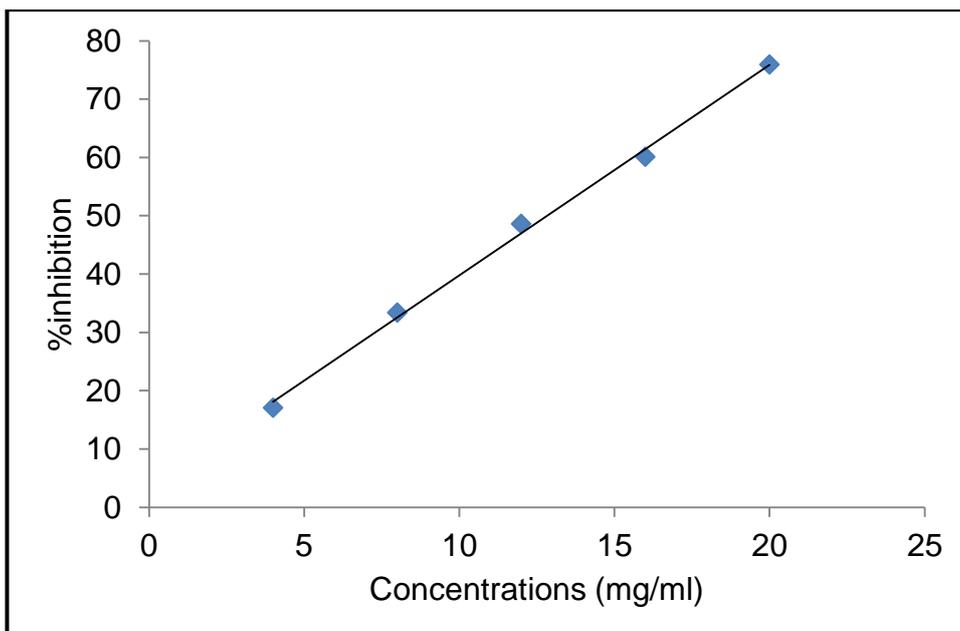


Figure 4.12 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en HVg.

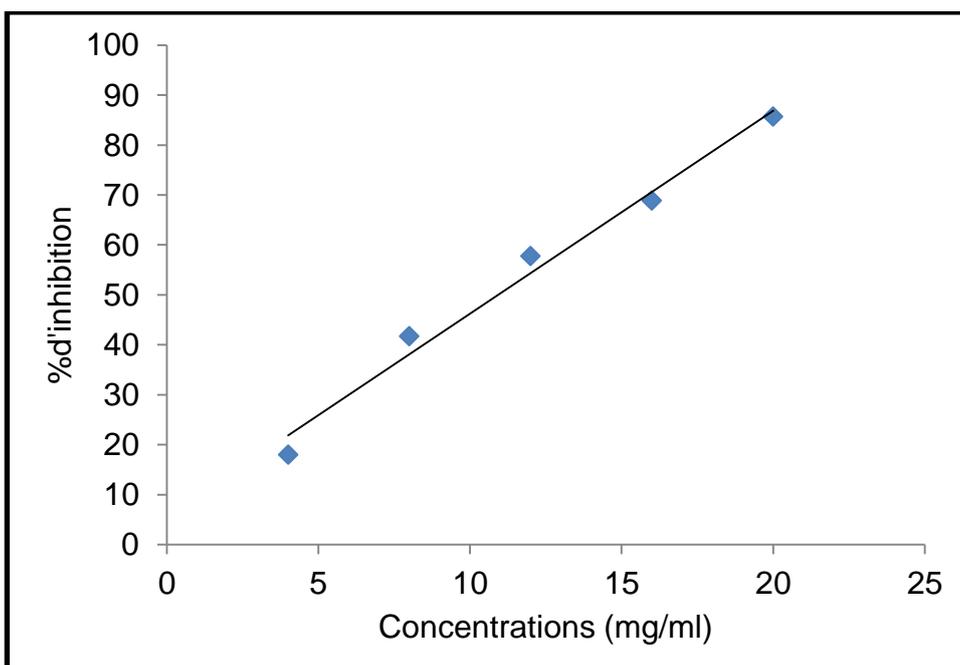


Figure 4.13 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en HVp.

D'après les figures 4.11, 4.12 et 4.13, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente exponentiellement avec l'augmentation de la concentration que ce soit pour la vitamine E ou pour les HV.

En comparant les trois courbes entre elles, on constate que la vitamine E agit à de très faibles concentrations et arrive à réduire presque la totalité du DPPH à une dose de 0.05mg/ml. Pour les deux autres HV, il s'avère qu'elles provoquent la réduction du DPPH dans le milieu réactionnel, mais à des concentrations beaucoup plus élevées.

Pour mieux caractériser l'efficacité (ou pouvoir) anti radicalaire, un paramètre essentiel est introduit : l'IC₅₀. Il se définit comme étant la concentration d'antioxydant (ou d'extrait) requise pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 50 % [163]. Les valeurs de l'IC₅₀ des différents extraits ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire :

$$Y = ax + b$$

Ou $Y = 50\%$ [180].

Les valeurs des IC₅₀ de chacun des extraits ont été déterminées et sont indiquées dans la figure 4.14. Aussi, l'IC₅₀ est inversement proportionnelle à l'efficacité antioxydante d'un composé. Cela veut dire que plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante (pouvoir antiradicalaire) d'un composé est grande.

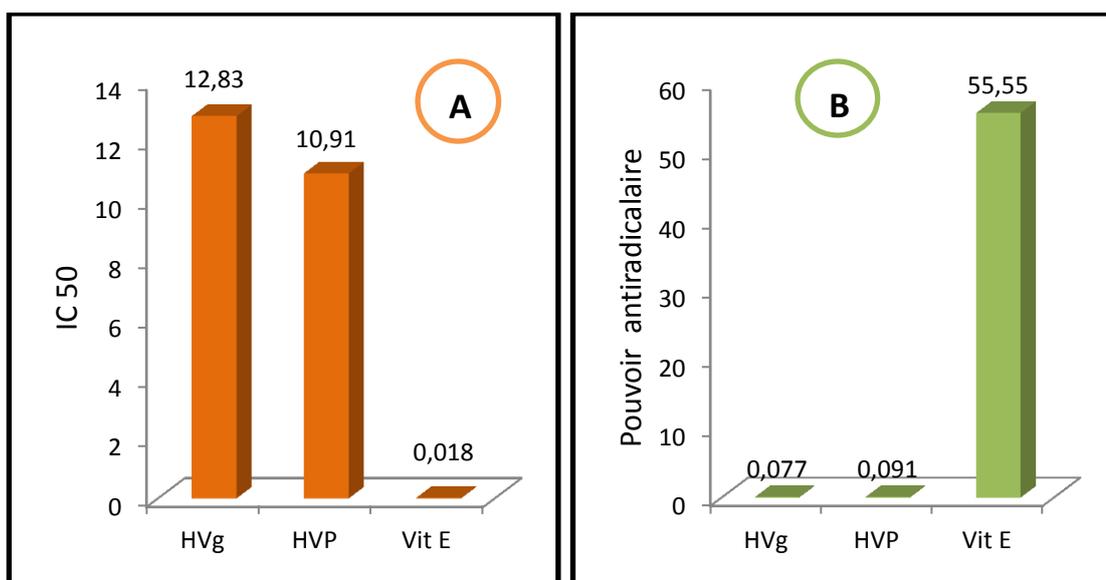


Figure 4.14 : (A) : IC₅₀ des différents extraits. (B) :Pouvoir antiradicalaire.

Il ressort de la figure 4. 14 (A) que le standard positif (vit E) présente une IC₅₀ très faible. C'est à la concentration de 0.018mg/ml qu'il provoque la réduction de 50% du DPPH présent dans le milieu. C'est un antioxydant très puissant qui possède une efficacité antiradicalaire très élevée à une dose infiniment petite, comme montre la figure 4. 14 (B).

A titre comparatif, il s'avère que les deux HV de la caroube présentent une efficacité antiradicalaire très faible et qui reste vraiment distante par rapport à celle de la vit E.

De la même figure (4.14), et en comparant les deux extraits lipidiques entre eux, on remarque que l'HVp présente une IC₅₀ un peu plus faible par rapport à l'autre (10.91 et 12.83mg/ml respectivement). Et par conséquent, elle a l'activité antioxydant la plus élevée.

N'ayant pas trouvé de travaux réalisés sur cette thématique de recherche, on déduit de nos résultats que les HV de la caroube ont une activité antioxydante très faible par rapport au standard positif, mais qui reste remarquable. Elle est probablement due à la teneur en vitamine E que peut contenir la caroube. En effet, les travaux de **Youssef et al. (2013)**, montrent que la pulpe contient de la vit E jusqu'à 5.377 µg / 100 g de matière sèche [21]. Cette propriété va lui conférer une plus grande stabilité vis-à-vis les problèmes d'oxydation lipidique.

De plus, les travaux effectués par de nombreux chercheurs ont montré que la pulpe et l'enveloppe tégumentaire des graines de caroubes contiennent des antioxydants naturels et qui peuvent être à l'origine de cette activité antioxydante. [22, 94] conférant ainsi à la caroube entière ou à ses fractions lipidiques un grand potentiel d'exploitation en industrie agro-alimentaire.

Afin de caractériser ces biomolécules actives, plusieurs études ont démontré que l'activité antiradicalaire manifestée par l'huile brute a été interprétée par une action combinée des différents antioxydants endogènes contenus dans l'huile et elle est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés d'une part [181, 182, 183, 184, 185]. D'une autre part, cette activité peut être à l'origine aussi aux constituants mineurs de la fraction insaponifiables ; comme les tocophérols et les composés phénoliques [186], de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile brute [187].

En effet, et comme il a été signalé par de nombreux auteurs, il est vraiment difficile d'attribuer l'effet antioxydant d'une huile à un ou à un certain nombre de molécules actives car cette HV est une mixture de différents constituants chimiques et qui peuvent aussi agir d'une manière synergique [188].

4.4.2. Activité antimicrobienne « test *in vitro* »:

Dans la recherche de méthodes alternatives de lutte antibactérienne, le règne végétal offre beaucoup de possibilités. De nombreuses études se développent actuellement pour isoler et identifier des composés de plantes qui ont une activité antibactérienne, antioxydante, antifongique et insecticide [189, 190, 191]. A cet effet, nous avons testé les HV de la caroube vis-à-vis quelques microorganismes très impliqués dans l'altération des denrées alimentaires.

L'activité antimicrobienne des HV de *Ceratonia siliqua* L, a été effectuée en suivant deux étapes: aromatochrome puis la méthode par dilution.

4.4.2.1. Antibiogramme :

Avant d'arriver aux extraits lipidiques (de caroube), nous avons tout d'abord recherché la sensibilité de ces microorganismes vis-à-vis des antibiotiques standards ; c'est l'antibiogramme. Nous avons testé l'action des trois (03) antibiotiques suivants, le Chloramphénicol, 30µg (CHL), l'acide Pipémidique, 20µg (PI), et l'acide Fucidique, 10µg (AF) sur chacune des souches. Les résultats qu'on a obtenus sont représentés dans la figure 4. 15.

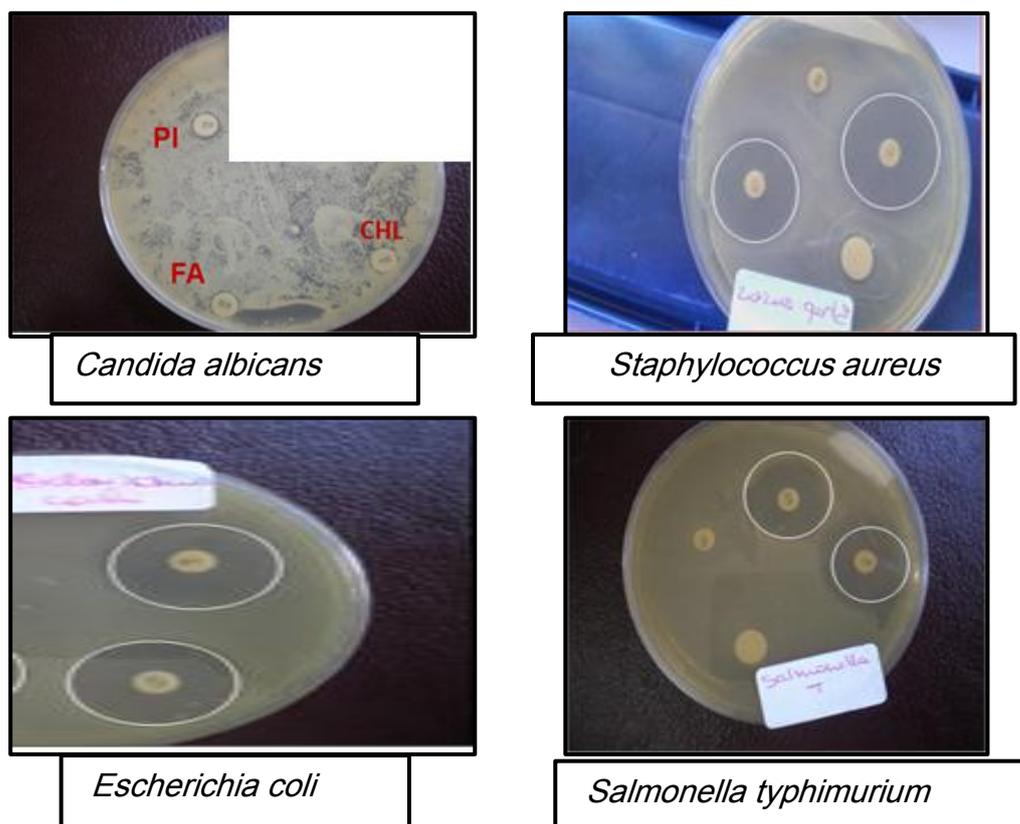


Figure 4. 15: Antibiogramme des souches testées.

A l'aide d'un pied à coulisse, on a mesuré le diamètre des zones d'inhibition (ZI) et on les a répertoriés dans le tableau 4.4

Tableau 4.4 : Résultats de l'antibiogramme (diamètres moyens des zones d'inhibitions \pm écarts types en mm).

La souche	CHL	PI	FA
<i>S. aureus</i>	26.45 \pm 0.015	9.86 \pm 0.01	29.88 \pm 0.05
<i>E. coli</i>	27.53 \pm 0.01	23.7 \pm 0.17	7.96 \pm 0.01
<i>S. typhimurium</i>	26.93 \pm 0.015	22.1 \pm 0.1	6.15 \pm 0.02
<i>C. albicans</i>	6.1 \pm 0.1	7.45 \pm 0.05	7.11 \pm 0.09

Pour mieux caractériser l'action des trois antibiotiques, et choisir l'ATB le plus actif sur chaque souche, à partir du tableau 4.4, nous avons élaboré l'histogramme représenté dans la figure 4. 16.

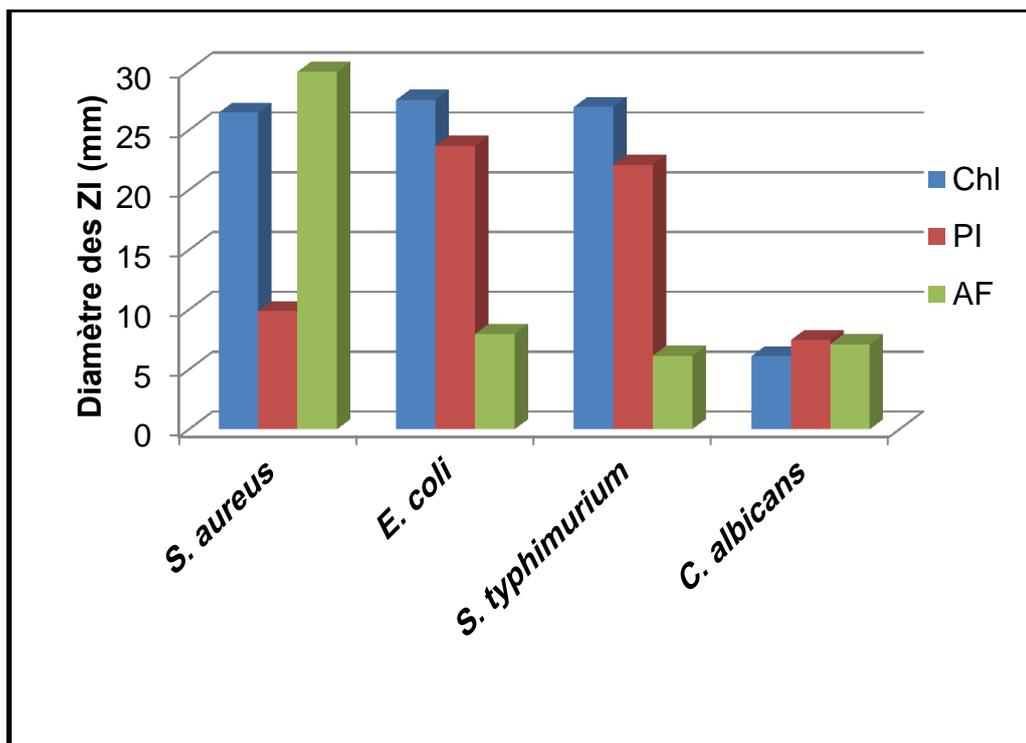


Figure 4. 16 : Diamètres moyens des ZI des ATB standards vis-à-vis chaque souche.

Il ressort de la figure 4. 16 que la plus part des souches bactériennes ont montré une sensibilité vis-à-vis deux antibiotiques (PI et CHL).

L'AF et le CHL sont très actifs sur la souche *Staphylococcus aureus* qui était extrêmement sensibles surtout vis-à-vis l'AF avec un diamètre moyen de 29.88 ± 0.05 mm.

En outre, la croissance d'*E. coli* a été stoppée par les trois antibiotiques mais parmi eux, le plus efficace est le chloramphénicol ou le diamètre de la zone d'inhibition est de 27.53 ± 0.0 mm.

L'autre bactérie « *S.typhimurium* » a été principalement inhibée par le chloramphénicol ou on a enregistré une zone d'inhibition de 26.93 ± 0.015 mm.

Concernant la levure *Candida albicans*, les trois ATB n'ont présenté aucun effet sur cette dernière. Elle est très résistante.

4.4.2.2. Aromatogramme :

Il est bien à signaler qu'aucune étude n'aurait été menée sur l'activité antibactérienne des huiles de caroube. Les observations effectuées sur leurs effets sur la croissance des souches microbiennes testées sont mentionnées dans les figures 4.17 et 4.18.



Candida albicans



Escherichia coli



Staphylococcus aureus



Salmonella typhimurium

Figure 4. 17 :Aromatogramme de l'HVg.



Candida albicans



Escherichia coli



Staphylococcus aureus



Salmonella typhimurium

Figure 4.18 : Aromatogramme de l'HVp.

La sensibilité des bactéries aux HV est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose et les résultats sont consignés dans les tableaux 4.5 et 4.6.

Tableau 4.5 : Diamètres des zones d'inhibition provoquées par l'HVG et degré de sensibilité des souches.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
Diamètres (mm)	7	10.5	8.00	24.77
Sensibilité	Résistante	Sensible	Résistante	Très sensible

Tableau 4.6 : Diamètres des zones d'inhibition provoquées par l'HVP et degré de sensibilité des souches.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
Diamètres (mm)	25	22.5	27.5	47.5
Sensibilité	Très sensible	Très sensible	Très sensible	Très sensible

NB : Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

Les résultats ci-dessus concernant l'activité antimicrobienne « *in vitro* » obtenus par la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme), montrent que les extraits par Soxhlet ont un effet inhibiteur sur la croissance des souches. Et cet effet est en fonction de la bactérie cible et varie d'un extrait à l'autre (de graines et de pulpe).

- Pour l'HVG :

En prenant en considération les diamètres d'inhibitions (Tableau 4.5), il est remarquable que toutes les souches bactériennes ont manifesté une résistance relative vis-à-vis l'huile des graines. En comparant ces résultats aux antibiotiques standards, il s'avère que l'extrait lipidique des graines n'a presque aucun effet antibactérien ni sur la croissance des *S. aureus* ni *S.typhimurium* ni *E.coli*.

En revanche, cet extrait a montré une activité antifongique très élevée avec un diamètre d'inhibition moyen de 24.77 mm, vis-à-vis la levure *C.albicans*. Ce taux d'inhibition sur la croissance fongique est hautement distant à celui des ATB standards utilisés. Donc, on peut déduire que l'huile des graines de caroube a une

très forte activité antifongique, corroborant ainsi les résultats de **Fadel et al. (2011)** qui ont testé cette activité sur la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum*. Pour ces auteurs cette activité pourrait être attribuée à l'acide oléique qui exerce une action antifongique très remarquable [146]. Ça se justifie dans notre cas, car l'HVg contient jusqu'à 40.58% de cet acide. Dans le même contexte, il a été déclaré que les acides gras insaturés en général comme l'acide linoléique et linoléique sont rapportés comme source de métabolites nommés oxylipines qui peuvent inhiber la croissance des champignons pathogènes [192].

Cette propriété confère à notre huile un potentiel à être valorisée en industrie agroalimentaire comme agent antimicrobien naturel.

- Pour l'HVp :

Il est bien remarquable que l'HVp se comporte différemment. D'après les résultats mentionnés dans le tableau 4.6, il est à noter que toutes les souches ont montré une extrême sensibilité vis-à-vis cette huile et l'effet antimicrobien le plus élevé a été enregistré sur *Candida albicans* avec une valeur moyenne de l'auréole d'inhibition de 47.5mm. Comme déjà cité, cela peut être dû à la richesse d'huile en acide oléique (15.92%) [146] et linoléique (43.09%) [192].

Par ailleurs, on a révélé une importante activité de l'HVp contre les autres bactéries à savoir *S.aureus*, *E.coli* et *S.typhimurium* ou les diamètres des ZI sont 25, 22.5 et 27.5mm respectivement. Cette forte inhibition du développement bactérien est due probablement, aux acides oléique et linoléique qui possèdent un effet inhibiteurs surtout vis-à-vis les Gram⁺ (*S.aureus*) [193], mais aussi aux AG à longues chaînes qui sont l'élément clé des additifs et des herbes à effet antibactériens [140].

Par ailleurs, et dans le but de comparer l'effet antimicrobien des HV le plus élevé, d'après les tableaux 4.4, 4.5 et 4.6 nous avons fait ressortir un histogramme comparatif, noté dans la figure 4. 19.

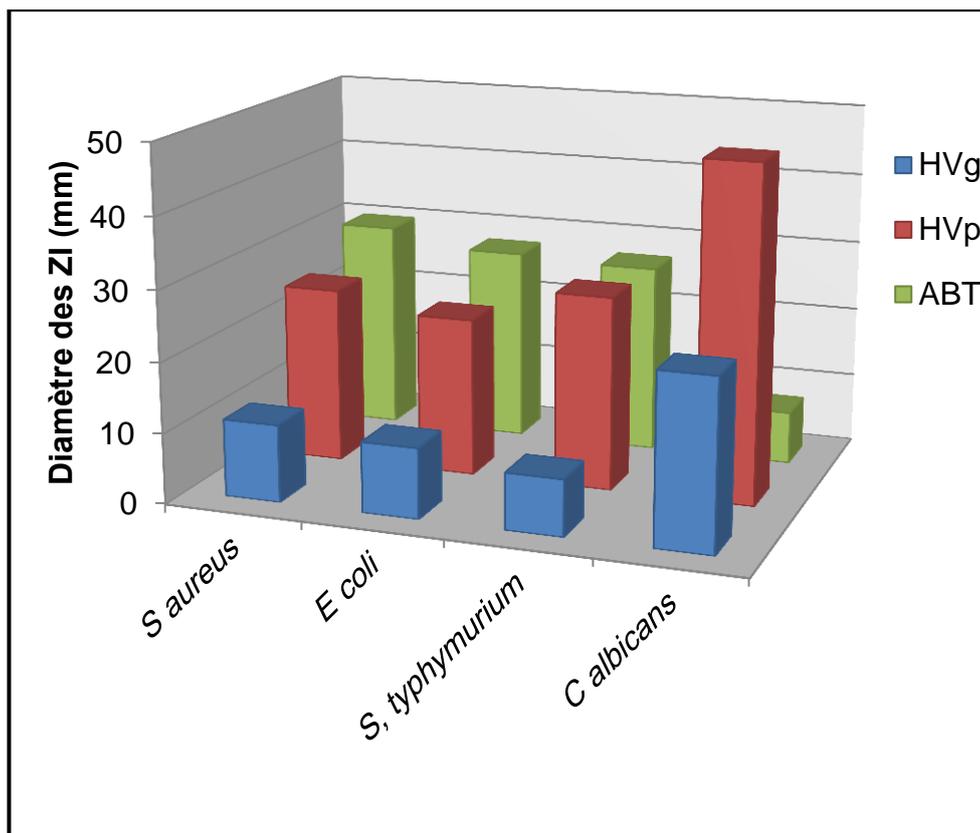


Figure 4.19 : Histogramme comparatif de l'effet antimicrobien des deux extraits et ATB.

Selon la figure 4.19, et en comparant les deux HV de caroube entre elles, il est bien remarquable que l'huile de pulpe a une action antibactérienne et antifongique la plus forte.

Pour chaque souche, on a établi le pouvoir antimicrobien par ordre décroissant de chaque échantillon, et on admet que :

L'action antibactérienne vis-à-vis la souche *S. aureus* a été enregistrée par ordre décroissant par AF, HVp puis HVg (les diamètres des ZI sont 29.88 ± 0.05 , 25 et 7mm respectivement).

Vis-à-vis la souche *E. coli*, le plus fort pouvoir antibactérien a été enregistré par le chloramphénicol, l'HVp puis par l'HVg et les diamètres des ZI sont respectivement 27.53 ± 0.01 , 22.5 puis 10.5 mm.

Pour la souche *S.typhimurium*, l'HVp est l'extrait qui présentait le plus grand effet antibactérien, suivi par le chloramphénicol puis par l'HVg avec des diamètres des ZI de l'ordre de 27.5, 26.93±0.015 et 8±00 respectivement.

Le plus fort pouvoir antifongique vis-à-vis la souche *C. albicans* a été enregistré par l'HVp (47.5mm) puis par l'HVg (24.77mm) et enfin par PI (7.45±0.05mm)

4.4.2.3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI):

Dans cette partie-là, nous avons effectué une série de dilution à base de Tween 80 afin de déterminer la CMI pour chaque extrait sur le développement de chaque souche. Par définition la CMI est la plus petite concentration d'un extrait capable d'inhiber la prolifération bactérienne.

Les CMI ont été calculées uniquement pour les HV qui ont préalablement montré un effet antibactérien important. Ainsi, et pour des raisons de performance antimicrobienne, les deux HV ont été sélectionnées. *Candida albicans* est la seule souche, parmi l'ensemble des microorganismes testés qui a révélé une sensibilité importante envers l'HVg.

Les résultats des diamètres des ZI sont mentionnés dans l'appendice G, et les CMI de chaque HV sont représentées dans le tableau 4.7:

Tableau 4.7 : les CMI de chaque extrait en %.

La souche	Huile des graines	Huile de pulpe
<i>S. aureus</i>	ND	12.5%
<i>E. coli</i>	ND	12.5%
<i>S. typhimurium</i>	ND	25%
<i>C. albicans</i>	<12.5%	<<<12.5%

ND : non déterminer.

Il ressort du tableau ci-dessus que l'HVg exerce un effet antifongique à la dilution 12.5% ; soit 125µl/ml. Ainsi, la CMI de l'HVg est aux environs de 125µl/ml.

Pour l'autre huile (de pulpe), il est à noter qu'elle exerce un effet antibactérien et antifongique même à des dilutions de l'ordre de 12.5%. On a observé un effet inhibiteur contre *S. aureus* à raison de 7.6mm comme zone d'inhibition, selon l'appendice G. Cette concentration correspond à une CMI de 125µl/ml.

En outre, à la dilution 12.5%, l'HVp a inhibé la croissance bactérienne d'*E.coli* ou le diamètre de la ZI est de 10mm. On peut déduire donc que la CMI de l'HVp vis-à-vis cette bactérie se situe aussi aux environs de 125µl/ml.

D'une autre part, cette huile a montré aussi un effet inhibiteur vis-à-vis *S.typhimurium* au bout de la dilution 25%. Le diamètre de la ZI est de 8mm. A cet effet, on retient la dilution 25% soit la concentration de 250µl/ml comme étant la CMI.

Ainsi, il est également très intéressant de noter qu'à la dilution 12.5%, correspondant à la concentration 125µl/ml, y a eu une inhibition de la croissance de *C.albicans* avec un halo de 15.0mm. La CMI correspondante donc serait inférieure à cette concentration. Et en raison du manque des extraits, nous n'avons pas pu réaliser d'autres essais avec des dilutions moins inférieurs.

CONCLUSION

Le lien entre l'alimentation et la santé n'est aujourd'hui plus à démontrer. Et cette préoccupation santé est de plus en plus mise en avant par les professionnels de l'agroalimentaire, de la santé et les consommateurs eux-mêmes. Il devient dès lors nécessaire d'apprendre à connaître les aliments et de s'intéresser aux bases de nutrition.

Le caroubier qui semble originaire des régions méditerranéennes est actuellement répandu dans de nombreux pays. Cet arbre reste très négligé et n'a pas eu encore la place qu'il mérite bien qu'il constitue l'une des ressources multi-usages à retombés socioéconomique et écologiques très intéressants.

De ses gousses, sont extraits deux produits différents, la pulpe et les graines, exploitées et utilisées dans de nombreuses industries (agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique,...).

De part de ses vertus, la caroube est très utilisée. En thérapeutique, elle est connue pour son effet régulateur sur la fonction intestinale, son effet hypocholestérolémiant, antiprolifératif, anti diarrhéique,....

Notre étude a été consacrée en premier temps pour évaluer la composition de la caroube. En vue de cette détermination, tous les métabolites primaires des graines et de la pulpe ont été dosés, à savoir l'eau, les cendres, les sucres totaux, la matière azotée totale, les fibres et la matière grasse. L'ensemble de ces paramètres testés pour nos deux matrices (graines et pulpe) ont montré des différences hautement significatives.

La fraction lipidique, de la pulpe et des graines a été caractérisée sur le plan composition en acides gras par le biais de la CGMS. Une différence non significative a été signalée pour le total des acides gras saturés et insaturés des deux fractions.

Par la suite, une caractérisation physicochimique et étude des activités antioxydante et antimicrobienne, ont été évaluées de cette même fraction lipidique.

La pulpe de la caroube a présenté un taux trop élevé de sucres totaux comparée avec les graines ($51.57\% \pm 0.08$ et $30.39\% \pm 0.52$ respectivement) avec une différence très hautement significative ($P < 0.1\%$). De même pour les fibres où la pulpe est d'autant plus riche que les graines avec de différences significatives ($P < 5\%$).

Par contre, les graines ont d'autant de protéines, de lipides et de cendres que la pulpe.

D'une autre part, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse montre que cinq acides gras connus sont présents dans l'huile des graines dont les principaux sont l'acide oléique et linoléique. Pour la pulpe, le profil chromatographique révèle huit acides gras représentés majoritairement par l'acide oléique, linoléique, myristique et caprique.

Par ailleurs, et tenant compte de la composition en vitamines de la caroube surtout la vitamine E, nous avons estimé le pouvoir antioxydant des huiles végétales. A titre comparatif, il s'avère que l'HV des graines présente une activité anti radicalaire proche de celle de la pulpe mais qui reste très faible comparée à la vitamine E.

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne montrent que l'extrait lipidique des graines a un effet antifongique très puissant vis-à-vis de la levure *Candida albicans*. Cet extrait s'est révélé presque inactif sur les autres souches bactériennes.

Par contre, l'huile de la pulpe s'est révélée très active en inhibant la croissance de toutes les souches bactériennes et fongiques.

A la lumière des résultats obtenus, nous pensons que d'autres recherches peuvent s'orienter vers l'analyse détaillée de l'huile de caroube, notamment le dosage des composés mineurs tels que polyphénols totaux (et leur caractérisation), des vitamines liposolubles, et autres métabolites. Aussi, l'étude de la composition en acides aminés, minéraux, vitamines et polyphénols que renferme la caroube serait également intéressante. Des essais d'incorporation de la farine de caroube en chocolaterie, biscuiterie ou en couscouserie constituent également de bonnes pistes de valorisation de ce fruit.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ait Chitt M., Belmir M. et Lazrak A., "production des plantes sélectionnées et greffées du caroubier", transfert de technologie en agriculture, N° 153, IAV ,RABAT, (2007), 1-4.
2. Berrougui H., "Le caroubier (*Cératonia siliqua* L), une richesse nationale aux vertus médicinales", s.l. : Maghreb Canada Express, Vol. 5. N° 9(2007).
3. Haddarah A., ismail A., bassal A., hamieh T.," morphological and chemical variability of lebanese carob varieties", European Scientific Journal, vol.9, No.18, (2013), 1857- 7431.
4. Battle L., Tous J.," carob tree, *Cératonia siliqua* L, promoting the conservatio and use of underutilized neglected crop", institute of plant genetic and crops plant reserch. : gaters leben/ international plant ressources institute, Rome, Italy, (1997).
5. Sbay H., et Abourouh M., "Rapport des espèces à usage multiples pourr le developpement durable: cas du pin et du caroubier", Centre de recherche forestière Haut Commissariat aux eaux et forets et à la lutte contre la desertification, Rabat,(2006),1-9.
6. Sanchez S., Lozano L. J., Godinez C., Juan D., Perez A., Hernandez F .J.,"Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas", Appl. Energy 87 (11), (2010), 3417–3424.
7. Turhan I., Bialka K. L., Demirci A., Karhan M.," Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*", Bioresource Technology 101, (2010), 5290–5296.
8. Vourdoubas J., Makris P., Kefalas J., Kaliakatsos G., "Industry and Climate Protection",In: Proceedings of the 12th National Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy,Amsterdam, (2002),489–493.
9. Bonnier G., "La grande flore en couleurs", (tome 3), (1990),309-310.
10. Sandolo, C., Coviello, T., Matricardi, P., Alhaique, F.,"Characterization of polysaccharide hydrogels for modified drug delivery", Eur. Biophys. J. 36 (7), (2007), 693–700.

11. Lizardo R., canellas J., mas F., torrallardona D., brufau J., "L'utilisation de la farine de caroube dans les aliments de sevrage et son influence sur les performances et la santé des porcelets", Journées de la Recherche Porcine. 34: (2002), 97-101.
12. Alvarez-Fuentes G., Garcia-Lopez G.C., Pinos-Rodriguez J.M., Aguirre-Rivera R.J., Jasso-Pineda Y., Celestino-Santillan S.G., "Effect of feeding the seed of *Prosopis laevigata*, *Acacia schaffneri* and *Ceratonia siliqua* L on the performance of broiler chicks", south african journal of animal science, 42 (4) , (2012),354-359.
13. Dakia P.A., Wathelet B., Paquot M., " Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia Siliqua* L.) seed germ", Food Chemistry, (2007),102, 1368 – 1374.
14. Khlifa M., Bahloul A., Kitane S., "Determination of Chemical Composition of Carob Pod (*Ceratonia Siliqua* L) and its Morphological Study", J.mater.enviroonn.sci. 4 (3), (2013), 348-353.
15. El Batal H., hassib A., ouatmane A., dehbi F., jaouad A., bouli A., "Sugar composition and yield of syrup production from the pulp of Moroccan carob pods (*cératonia siliqua* L)", Arabian Journal of Chemistry ,(2011), 1-5.
16. Shawakfeh K., and ereifej K. I., " Pod Characteristics of two *Ceratonia siliqua* L. Varieties from Jordan", Ital. J. Food Sci, 17 (2), (2005), 187–194.
17. Thomson p., "The carob in California. California Rare Fruit Growers ", Yearbook 3, (1971),61–102.
18. Zunft H.J., luder W., harde A., haber B., graubaum H.J., gruenwald J., " Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia", Adv. Ther,18,(2001),230–236.
19. Zunft H.J., Luder W., Harde A., Haber B., Graubaum H.J., Koebnick C., Gruenwald J., " Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients", Eur. J. Nutr, 42, (2003), 235–242.
20. El hajaji H., Farah A., Ennabili A., Bousta D., Greche H., El bali B., Lachkar M., "Etude comparative de la composition minérale des constituants de trois catégories de *Ceratonia siliqua* L. (Comparative study of the mineral composition of

the constituents of three varieties of *Ceratonia siliqua* L.) ", J. Mater. Environ. Sci. 4 (2), (2013),165-170.

21. Youssef M. K. E, El Manfaloty M.M., Ali H.M., "Assessment of Proximate Chemical Composition Nutritional Status, Fatty Acid Composition and Phenolic Compounds of Carob (*Ceratonia siliqua*)", Food and Public Health, 3(6), (2013), 304-308.

22. Batista, M.T., Amaral, M.T., Proença Da Cunha, A.,. "Carob fruits as source of natural oxidants", In: Proceedings of the Communication in Third International Carob Symposium, Tavira, Portugal, June,(1996),19–23.

23. Bastida S., Sánchez-Muniz F. J., Olivero R., Pérez-Olleros I., Ruiz-Roso B., Jiménez-Colmenero F.," Antioxidant activity of Carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage", Food Chemistry 116 ,(2009), 748–754.

24. Catarino F.,"The carob tree; an exemplary plant", Naturopa 73, (1993),14-15.

25. Hillcoat D., Lewis G., Verdcourt B.,"A new species of *Ceratonia siliqua* L from Arabia and the Somali Republic", Kew Bull, 35(2), (1980), 261-271.

26. Gharnit N.,"Caractérisation et essai de régénération in vivo du caroubier(*Ceratonia siliqua* L) originaire de la province de Chefchaouen (nor ouest du maroc)", These de doctorat en science, Université Abdelmalek Essaidi. TANGER, (2003).

27. De Candolle A.,"L'origine des plantes cultivées", Balière, Paris, France : s.n., (1983).

28. Vavilov N. I.,"The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants", s.l. : the ronald press Co. New York, (1951).

29. Schweinfurth G.,"Sammlung arabisch-aethiopischer Pflanzen, Ergebnisse von Reisen in dem Jahren 1881, 1888-89, 1891-92. Bull, Herb. Boissier 2: 1-114. (1894).

30. Zohary D.,"The place of origin and the nature of dioecy in the carob (*Ceratonia siliqua* L)", Nucis-Newsletter, 11, (2002), 38-40.

31. Zohary M., "Geobotanical foundations of the middle east", 2 vol. shtutgart, (1973).
32. Bolonos M., "Rapport sur le caroubier", instituto forestal de investigaciones y experiencias, Madrid (Espagne), p. 9.
33. Goldblatt P., "Cytology and phylogeny of leguminosea. Royal Botanic gardens", Kew. England, Vol. 2, (1981), 427-464..
34. Bures P., Pavlicek T., Horova L., and Nevo E., "Microgeographic genome size differentiation of the carob tree (*Cératonia siliqua* L), at Evolution canyon", Israel. s.l. : An Bot, 93, (2004), 529-535.
35. Boudy P., "Economie forestière nord Africaine, Monographie et traitement des essences forestières", la rousse, Paris, Vol. 2, (1950), 443-445.
36. Karababa E., Coskuner Y., "Physical properties of carob bean (*Cératonia siliqua* L): an industrial gum yield crop", industrial crops and products, 42, (2013), 440-446.
37. Shigenori K., Masa T., Yasuyuki S., Masayo S., Mi-sun K., Tsutomu N., "Antioxydant activity of polyphenols in carob pods", J Agric, Food chem, 50, (2002), 373-377.
38. Rejeb M. N., Laffray D., and Louget P., "Physiologie du caroubier (*Cératonia siliqua* L) en Tunisie. physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi arides. groupe d'études de l'arbre", Paris, France., (1991), 417-426.
39. Youssif A.K., Alghazawi H.M., "Processing and characterisation of carob powder", Food chemistry , 69, (2000), 283-287.
40. Mozaffarian V. A., "Dictionary of Iranian plant names", Farhan Moaser Publication, Tahran, (1996), 102 -103.
41. Rejeb MN., "Le caroubier en tunsie: situations et perspectives d'amélioration. dans quel avenir pourr l'amélioration des plantes?", Ed AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris, (1995), 79-85.
42. Fletcher R., "Carob agroforestry in portugal and spain", The australian new crops newsletter, issue N°7, (1997).

43. Battle I. J., and Tous, "Lineas de investigation sobre algarrobo (*Cératonía siliqua* L) en el IRTA, Cataluna (España)", in Brito de Carvalho JH, Ed I Encorto Linhas de investigation de algarrobo, AIDA, Oeiras: AIDA, (1988), 92-104.
44. Thomas V., Metha A.R., "Effect of phloroglucinol on shoot growth and initiation of roots in carob tree cultures grown in vitro", In Sen S K., Giles K L. ed , Proc. Int. Plant cell cult. Crop improvement, Calcutta India, New York and London: Plenum Press, (1983), 451-457.
45. Konate I., Filali Maltouf A., and Berraho E., "Diversity analysis of Moroccan carob (*Cératonía siliqua* L) accessions using phenotypic traits and markers", *Acta Botanica Malacitana*, 32, (2007), 79-90.
46. Tucker S. C., "The developmental basis for sexual expression in *Cératonía siliqua* L. ", *Am. J. Bot.* 79(3), (1992), 327-367.
47. Gharnit N., El Mtili N., Ennabili A., Sayah F., " Floral characterization oof carob tree (*Cératonía siliqua* L) from the province of Chefchaouen (NW of Morroco)", *Morrocan J. Biol.*, (2004), 41-51.
48. Romano A., Barros S., Martins-Louçao M.A., "Micropropagation of the mediterranean tree *Cératonía siliqua* L. ", *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, Vol 68. N°1, (2002), 35-41, 129p.
49. Dellaporta S.L., Calderron-Urrea A., "Sex determination in flowering plants", *Plant Cell*, 5(10), (1993), 1241-1251.
50. Irwin H.S., Barneby R.C., "Cassieae, advances in legume systematics", Royal Botanic Gardens, Kew, Vol N°1. Polhill (R.M), Raven (P.H) Eds, England, (1981), 97-106.
51. Retana J., Ramoneda J., Garcia Del Pino F., Bosch J., " Flowering phenology of carob (*Cératonía siliqua* L)", *J. Hortic. Sci.*, 69(1), (1994), 97-103.
52. Marakis S., "Carob bean in food and feed: curent status and future potentials- acritical appraisal", (1996), 365-383.
53. Tous J., Battle I., Romeo A., "Prospeccion de variedades de algarrobo en Andalucia", *informacion tecnica economica agrari*, 91V(3) (1995).

54. Mirhaydar H., "Plant information: plant usage in diseases treatment", Farhang Islami Press, Iran, (1994), 115.
55. Mokhtari M., Sharifi S., and Shahamir Tabatabae M., "The effect of hydroalcoholic seeds extract of *Cératonia siliqua* L on the blood glucose and lipids concentration in diabetic male rats", International conferences on life science and technology IPCBEE vol 3, IACSIT Press, Singapore, (2011),
56. Aafi A., "Notes techniques sur le caroubier (*Cératonia siliqua* L)", Centre national de la recherche forestière, Rabat (Maroc), (1996), 10p.
57. Fournier P., "Les quatres flores de la France (générale, alpine, méditerranéenne, littorale)", le chevalier, paris, (1977).
58. Ortiz P.L., Arista M., Talavera S., "Produccion de nectar y frecuencia de polinizadores en *Cératonia siliqua* L (Caesalpinaceae)", Anales del jardin botanico de Madrid 54, (1996), 540-546.
59. Passos de Carvalho J., "Carob polinization aspects", (1988), 281-291. In Proceeding of the international carob symposium (Fito P and Mulet A eds). Valencia. Spain.
60. Baum N., "Arbres et arbustes de l'Egypte ancienne", (1989), 354p.
61. Zouhair O., "Le caroubier: situation actuelle et perspectives d'avenir", document interne, eaux et forets, maroc, (1996), 22p.
62. Gharnit N., El mtili N., Ennabili A., Sayah F., "Importance socioéconomique du caroubier (*Cératonia siliqua* L) dans la province de Chefchaouen (nord ouest du maroc)", J.BOT.SOC.BOT, France, 33, (2006), 43-48.
63. Elvio B., "I fruttiferi minori in Europa, Frutticoltura professionale", Ed. l'Informatora Agrario, Verona, (2002), 190.
64. Winer N., "The potencial of the carob (*Cératonia siliqua* L)", Int. Tree Crops J. 1, (1980), 15-26.

65. Hariri A., Ouis N., Sahraoui F., Bouhadi D., "Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube", *rev microbiol.ind.sant et environn*, (2009),37-55.
66. Girolamo, R., Laura, D., "Evaluation and preservation of genetic resources of carob (*Cératonia siliqua* L)in southern of italy for pharmaceutical use", *reeding research on aromatic and midicinal plants* 9, (2002),367-372.
67. Avallone R.,Plessi M., Baraldi M., Monzani A.,"Determination of chemical composition of carob (*Cératonia siliqua* L): proteines, fat, carbohydrates and tannins. *J of food composition and analysis*", 10, (1997), 166-172.
68. Corci I., Avallone R., Cosenza F., Farina F., Baraldi C., Baraldi M.,"Antiproliferative effects of *Cératonia siliqua* L on mouse hepatocellular carcinoma cell line.*fitoterapia*",ed elsevier,(2002),73, 674-684.
69. Correia P.J., Martins-louc M.A.,"The use of macronutrients and water in marginal mediterranean areas: the case of carob tree", *field crops res.*(2005),91, 1-6.
70. Quezel P., et Santa S.,"Nouvelle flore de l'algerie et des régions desertques méridionales (tom1)",*Edition du centre national de la recherche scientifique*,(1963), 557p.
71. Rebour H., "Fruits méditerranéens", *La maison rustique*, paris ,(1968),33.
72. ANRH. "L'atlas pratique de l'Algérie", *Edition de l'armé*,(2004).
73. FAOSTAT. www.fao.org. (2010).
74. Biner B., Gubbuk H., Karham M., Aksu M., Pecmeczi M.,"Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey", *Food Chemistry* 100, (2007),1453-1455.
75. Kivçak B., Mert T., Ozturk H .T.,"Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ceratonia siliqua* L extracts", *Turk .Journal .Biology.* 26, (2002),197–200.
76. Papaconstantinou Orphanos P. I., "The carob varieties of cyprus", *Tec. bull. 5.cyprus agricultural research institute. ministry of agriculture and natural ressources.nicosia*,(1969).

77. MAPA. "Ministerio de Agriculture, Pesca Y Alimentación. Anuario de estadística agraria", ed.secretaria general tecnica, madrid. spain, (1994).
78. Caja G., Albanell E., Casanova R.,"Caracterización morfológica de frutos de algarrobo cultivados en España", In: Proceedings of the II International Carob Symposium,Valencia, Spain, September 29–October 1, (1988),119–129.
79. Owen R W., Haubner R., Hull ww E., Erben G., Spiegelhalder B., Bartsch H., Haber B.," Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre", Food Chem. Toxicol. 41, (2003), 1727–1738.
80. Naghmouchi S., Khouja M. L., Romeo A., Tous J., Boussaid M.," Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel", Sci.Hort.121, (2009),125–130.
81. Sidina M.M., El hansali M., Wahid N., Ouatmane A., Bouli A., Haddioui A.," Fruit and seed diversity of domesticated carob *Cératonia siliqua* in morrocco", scientia horticulturae. 123, (2009),110-116.
82. Coit J. E.," Carob culture in the semi-arid southwest", Vista, CA: J. Eliot Coit, (1962), 6p.
83. Nas.," Tropical legumes: resources for the future", National Academy of Sciences, Washington DC. USA, (1979), 109- 116.
84. Bernardo-gil G.M., Roque R,Roseiro L.B., Duart L.C., Girio F., Esteves P.," Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonia siliqua* L.)", J. of Supercritical Fluids 59 (2011) 36– 42.
85. Santos M., Rodrigues A., Teixeira J.A.," Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides*", Biochemical Engineering Journal, 25 (1),(2005),1–6.
86. Papagiannopoulos M., Wollseifen H. R., Mellenthin A., Haber B., Galensa R.," Identification and quantification of polyphenols in carob fruits and derived products by HPLC-UVESI/MRN", J.agric. food chem,52, (2004),3784-3791.
87. Haber B.,"Carob fiber benefits and application", Cereal Foods World 47, (2002), 365–369.

88. Silanikove N., Landau S., Or d., Kababyaa D., Bruckental I., Nitsan Z. "Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods on feed intake, digestive and metabolic responses of kids", *livestock science* 99, (2006),29-38.
89. Anonyme. "National Toxicology Program.Carcinogenesis Bioassay of Locust bean gum (cas N° 9000-40-2) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study)",*National toxicol program tech per ser*, 221, (1982),1-99.
90. Bouzouita N., Khaldi, A., Zgoulli, S., Cheli, L., Chekki, R., Chaabouni, M. M., and Thonart, P., "The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia", *Food Chem*, 101,(2007), 1508 – 15.
91. Lopez a S., "Lipids from the seeds of passion fruit (*Passiflora edulis*)", *Rev. Theob*, 10, (1980),47–50.
92. Yashida H., Hirakawa Y., Abe S., " Roasting influences on molecular species of triacylglycerols in sunflowers seed (*Helianthes annuus L.*)", *Food Res. Int*, 34, (2001), 613–661.
93. Nyanzi S., Carstensen B., Schwack W., " A comparative study of fatty acid profiles of passiflora seed oil from uganda", *j.am. oil chem. soc.* 82, ,(2005),41-44.
94. Makris D.P., Kefalas P., "Carob pod as a source of polyphenolic antioxydants, *food technolo biotechnolo.* 42 (2), (2004),105-108.
95. El batal H., Hasib A., Ouatmane A., Boulli A., Dehbi F., Jaouad A., "yield and composition of carob bean gum produced from different morroccan populations of carob (*Ceratonia siliqua L*)", *J. Mater. Environ. Sci.*4 (2), (2013),309-314.
96. Wang Y., Belton P.S., Bridon H., Garanger E., Wellner N., Parker M.L., Grant A., Feillet P., Noel T R., "Physicochemical studies of caroubin: a gluten-like protein", *J. Agric. Food Chem.* 49, (2001), 3414– 3419.
97. Boza J .J., Maire J. C., Bovetto L., Balleve O., "Plasma glutamine response to enteral administration of glutamine in human volunteers", *Nutrition* 16, (2000),1037– 1042.

98. Ayaz F .A., Torun H., Ayaz S., Correia P. J., Alaiz M., Asanz C., Cruz J., Strand M.," Determination of chemical composition of Anatolian carob pod: Sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds", *Journal of Food Quality*, 30, (2007),140-1055.
99. Whiteside L.," *The carob cookbook*", Ed. Thorsons Publishers Limited, Wellingborough. Northamptonshire. (1981).
100. Craig W. J. T.,and Nguyen T.," Caffeine and theobromine level in cacao and carob products", *J. Food Sci.* 49, (1984),302-305.
101. Moniz P.,"Estudo da Produção de Manitol a partir de Xaropes de Alfarroba. msc thesis", instituto superior de estudos interculturais e transdisciplinares instituto Piaget, almada, portugal. (2008).
102. El allagui A.I.,"Action de différents extraits végétaux sur la mortalité des nématodes à galles du genre *Meloidogyne* ssp.", *Rev.Tela Botanica Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France BDNFF*, Vol. 4. N°4. ,(2007),
103. Klenow S., GLei M., Haber B., Owen R., Pool-zobel L.," Carob fiber compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells", *Food Chem. Toxicol.* 46 (4), (2008),1389–1397.
104. Min B .R., and Hart S. P.," Tannins for suppression of intestinal parasites", *J. Anim. Sci.* 81(2003),102-109. ,
105. Serairi-Beji R., Mekki-Zouiten L., Tekaya-Manoubi L., Loueslati M. H., Guemira F,Ben Mansour S.," Can carob powder be used with oral rehydration solution for the treatment of acute diarrhea", *Med. Top.* 60, (2000),125.128. ,
106. Garcia-Ochao F., and Casa J.," Viscosity of locust bean (*Ceratonia siliqua*) gum solutions", *J. Sci. Food Agri.* 59, (1992),97- 100,
107. Hoichman D., Gromova L. I., Sela J.," Synergistic gel formation in aqueous solutions of guar–gellan composition", *Pharmaceutical Chemistry Journal* 41, (2007), 42–45.

108. Custodio L., Escapa L., Patarra J., Aligué R., Albericio F., Neng N.R., Florencio Nogueira J .M., Romano A.," Sapwood of Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) as a Potential Source of Bioactive Compounds. *Records of natural products*", 7:3 ,(2013) ,225-229.
109. Aksit S., Caglayan S., Cugan R., Yaprak I.," Carob bean juice : a powerful adjunct to oral rehydration solution treatment in diarrhoea", *Paediatr. Perinat. Epidemio*, 12 , (1998), 176-181.
110. Boyer A., "Design de nouveaux synthons dérivés de l'acide oléique: application à la synthèse de polyuréthanes",Thèse de doctorat, École Doctorale Des Sciences Chimiques. Université de Bordeaux1, (2010),112.
111. Bereau D., "Huiles et fractions insaponifiables de huit especes de Palmiers amazoniens", Thèse de doctorat en sciences des agroressources.de l'institut national polytechnique de toulouse, (2001),51-52-53.
112. Wu W. H.,"The contents of lignans in commercial sesame oils of Taiwan and their changes during heating", *Food Chemistry*, 104, (2007),341–344.
113. Lerma García M.J., "Characterization and Authentication of Olive and OtherVegetable Oils", *springer Theses*, DOI: 10.1007/978-3-642-31418-6_1,., 2012.
114. Serani A., Piacenti D., kinetics of pheophitine-A photodecomposition in extra virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 69,(1992),469-470.
115. Boskou. D., "Olive oil", In: Gunstone FD (ed) *Vegetable oils in food technology*. CRC press. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, (2002), 244–277.
116. Morales M .T., Tsimidou M.," El papel de los compuestos volátiles y polifenoles en la calidad sensorial del aceite de oliva", In: Aparicio R, Harwood J (eds) *Manual del aceite de oliva*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, (2003),381–442.
117. Hidalgo F.J, Zamora R., "Trends", *Food Sci Technol*, 17,(2006),56.
118. Martini M.C, Seiller M.," Actifs et additifs en cosmétologie- Technique et documentation", *lavoisier, paris*, (1992), 211-234.

119. Blekas G., Tsimidou M., Bouskou D. " Contribution of α -tocopherol to olive oil stability". *Food Chem* 52, (1995),289-294.
120. Manzi P., Panfili G., Esti M., Pizzoferrato L., "Natural antioxydants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from diferent cultivars". *J Sci Food Agric* 77, (1998),115-120.
121. Psomiadou E., Tsimidou M., " simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxydation". *J Agric Food Chem*, 46, (1998),5132-5138.
122. Leger C. L., "La vitamine E : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovasculaire, biodisponibilité - OCL", 7(3) , (2000),258-265.
123. Janero D. R., "Therapeutic potential of vitamin E against myocardial ischemic reperfusion injury- Free radical biology and Medicine", 10 ,(1991),315-324.
124. Al Moutairy A. R., "Effect of vitamin E and selenium on hypothermic restraint stress and chemically-induced ulcers", *Digestive diseases and sciences*, 41(6), (1996), 1165-1171.
125. Edmonds S. E., Winyard P. G., Guo R., Kidd B., Merry P., Langrish-smith A., Hansen C., Ramm S., Blake D. R., " Putative analgesic activity of repeated oral doses of vitamin E in the treatment of rheumatoid arthritis - Results of a prospective placebo controlled double blind trial ", *Annals of the rheumatic diseases*, 56 , (1997), 649-655 .
126. Ambrosone C.B., Marshall J.R., Vena J.E., Laughlin R., Graham S., Nemoto T.Freudenheim J .L., "Interaction of family history of breast cancer and dietary antioxydants with breast cancer risk (new york, usa)", *cancer causes and control*, 6, (1995), 407-415.
127. Grimble R. F., "Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications ", *International J. Vit. Nutr. Res.*, 67 ,(1997), 312-320.
128. Peskind E. R., Pharmacologic approaches to cognitive deficits in Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry*, 59(9) , (1998), 22-27.

129. Hellenbrand W.,Boeing H., Robra B-P., Seidler A., Vieregge P., Nischan P., Joerg J., Oertel W.H., Schneider e. Ulm G., "Diet and parkinson's disease II: a possible role for the past intake of specific nutrients- results from a self administered food frequency questionnaire in a case control study", *neurology*, 47, (1996),644-650.
130. Rossell J. B.,"Vegetable oils and fats", In: Rossell JB, Pritchard JLR (eds) *Analysis of oil seeds, fats and fatty foods*. Elsevier Science, London, (1991), 261–327.
131. H., Weil J.,"Biochimie générale", Paris, Dunod, (2001),263p.
132. Cuvelier C., Cabaraux J. F., Dufrasne I., Hornick J. L., Istasse L.,"Acides gras : nomenclature et sources alimentaires", *Ann. Méd. Vét*, 148, (2004), 133-140.
133. Jacotot B., Campillo B.,"Nutrition humaine, connaissances et pratiques", ed masson. paris, (2003),311p.
134. Lefils-Lacourtablaise J.,"Métabolisme et fonctions des acides gras oméga-3 à longue chaîne au niveau de l'adipocyte", Thèse de doctorat,en biochimie. L'institut national des sciences appliquées de Lyon, (2010). 162 p.
135. Magali P.,"Profil et métabolisme des acides gras dans les tissus de la perche commune *perca fluviatilis L*", thèse de doctorat en sciences agronomiques, institut national polytechnique de Lorraine,(2008). 192 p.
136. Cescut J.," Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique : physiologie et performances de procédés", These de doctorat en Ingénieries Microbienne et Enzymatique, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse,(2009). 301p.
137. Gunstone F. D., "Structured and modified lipid". Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. (2001). pp 132-489.
138. Calder P. C., "The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory process, athérosclérosis and plaque stability", *molecular, nutrition and food research*, 56, (2012),1073-1080.
139. Carballeira N .M., Emiliano A., Hernandez-alonso N., Gonzalez F.A.," Facile total synthesis and antimicrobial activity of the marine fatty acids (Z)-2-methoxy-5-

hexadecenoic acid and (Z)-2-methoxy-6-hexadecenoic acid", *Journ. natu.prod.* 61, (1998),1543-1546.

140. Zheng C. J., Yoo J., Lee T., Cho H., Kim Y., Kim W., " Fatty acid synthesis is target for anti bacterial activity of unsaturated fatty acids", *FEBS lett.* 579, (2005),5157-5162.

141. Macdonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F. et Morgan C.A., "Animal nutrition", 5th ed. harlow, longman scientific et technical, (1995), 607 pages.

142. CRAWFORD MA., "Background to essential fatty acids and their prostanoid derivatives", *Br Med Bull*, 39 (3), (1983),210-3.

143. Carey D. P., Norton S. A. et Bolser S. M., "Review of Omega-3 fatty acids and dietary Influences on tissue concentrations", *Recent Advances in canine and feline nutritional research. vol.1.* wilmington, orange fraser press, (1996),35-42.

144. Logas D., Beale K .M., Bauer J.E., "Potential clinical benefits of dietary supplementation with marine-life oil", *J Am Vet Med Assoc*, 199 (11), (1991), 1631-6.

145. Couedelo L., " Biodisponibilité nutritionnelle de systèmes colloïdaux riches en acides gras poly-insaturés : Etudes in vivo et in vitro",. thèse de doctorat en chimie physique.L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1,(2011),

146. Fadel F., Chebli B., Tahrouch S., Benddou A., Hatimi A., "Activité antifongique d'extraits de *Ceratonia siliqua* sur la croissanc in vitro de *penicilium digitatum*", *bull. soc. pharm.bordeau*, 150(1-4), (2011), 19-30.

147. Audigie C. L., "Manipulation d'analyse biochimique", Ed. Doin. Paris, (1978), 27-74.

148. Kjeldahl., "Meue method lurk besyimmung des stichs offs in organischem korpon", *Z Anal. Chem.*, Vol. 22,(1983),366-382.

149. Dubois M. K .A., Gilli Y. K., Hamilton P. A., " Colorimetric method for determination of sugar and related substances", *Anal & chem Jour.* Vol 28, (1956), 350-356.

150. Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis B.A., "Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition", *J. Dairy Sci.* 74, (1991), 3583-3597.
151. AFNOR., "Méthodes d'analyses des corps gras, grains oléagineuses, produits dérivés", Collection AFNOR, France, (1988), 455p.
152. Matthaus B., Ozcan M. M., "Lipid evaluation of cultivated and wild carob (*Ceratonia siliqua L.*) seed oil growing in Turkey", *Scientia Horticulturae* 130, (2011), 81–184.
153. Bouchonnet S., Libong D., "Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse", Département de chimie, Laboratoire des mécanismes réactionnels, Ecoles polytechnique, Palaiseau CEDEX, (2002).
154. Bessombre. C., "Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécaniques d'herbes aromatiques", Application généralisée thèse de doctorat de l'université de la Rochelle. France, (2008),
155. Cavalli G. F., "Caractérisation par CPG /IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huile essentielle de Madagascar", Thèse de doctorat de l'université de Corse, (2002).
156. Petrović M., Kezić N., Bolanca V., "Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples", *Food Chemistry*, 122(1), (2010), 285–291.
157. Petrović M., Debeljak Z., Kezić N., Dzidara P., "Relationship between cannabinoids content and composition of fatty acids in hempseed oils", *Food Chemistry*, 170, (2015), 218–225.
158. Poknory J., Yanihlieva N., Gordon H., "Les antioxydants dans les aliments. Les applications pratiques", Woodhead publishing limited. CRC press, Cambridge, Angleterre, (2001).
159. Sanchez-moreno C., "Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems", *International Journal of Food Science and Technology*, 8, (2002), 121-137.

160. Molyneux P., "The use of the stable free radical diphenyl picryl hydrazyl DPPH for estimating antioxydant activity". Songklanakarinn. Journal of Science and Technology, 26(2), (2004), 211-219.
161. Panichayupa K P., Kaewsuwan S., " bioassay-guided isolation of the antioxydant constituents from *cassia alata L leaves*". Songklanakarinn. Journal of Science and Technology, 26 (1), (2004), 103-107.
162. Maznah I., Abdalbasit M., Gururaj B and Hoe S. L., "Fatty acid composition and antioxidant activity of oils from two cultivars of Cantaloupe extracted by supercritical fluid extraction, grasas y aceites", ENERO-marzo, 61(1) (2010), 37-44.
163. Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M., Khoshnoodi M., "In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora Boiss*", Food Control. 18, (2007), 800-805.
164. Deans S.G., Ritchie G., " Antibacterial properties of plant essential oils" International Journal of Food Microbiology ,5,(1987), 162-180.
165. Zaika L. L., "Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its determination", Journal of Food Safety 9- 2,(1988), 97-118.
166. Carson C.F., Riley T.V. , "Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*" ,Journal of Applied Bacteriology 78, (1995), 264-269.
167. Burt S A., Reinders R.D., "Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli O157:H7*", Letters in Applied Microbiology 36- 3,(2003),
168. Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S., "In vitro antibacterial activity of some plant essential oils", BMC Complement Altern Med,(2006), 6,39.
169. Vekiari S.A., Ouzounidou G., Ozturk M., Gork G., "Variation of quality characteristics in Greek and Turkish carob pods during fruit development", procedia social and behavioral sciences ,19, (2011), 750-755.
170. Linden G., et Lorient D., "Biochimie agroindustrielle valorisation alimentaire de la production agricole", Edition Masson, (1994), 75.

171. Ayaz F.A., Torun H., Glew R H., Bak Z D., Chuang L.T., Presley J.M., Andrews R., "Nutrient Content of Carob Pod (*Cératonia siliqua L*) Flour Prepared Commercially and Domestically", *Plant Foods Hum Nutr.*, vol. 64, (2009), 286-292.
172. Albanell E., Caja G., Plaixats J., "Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles", *Cahiers Options Mediterranean* 16, (1991).135–136.
173. Dakia P.A., Blecker C., Robert C., Wathelet B., and Paquot. M., "Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pretreatment", *food hydrocolloids*, Vol 22. N°5. (2008), 807-818.
174. Youssef M .K .E., El Manfaloty M.M., Ali H.M., "Assessment of Proximate Chemical Composition, Nutritional Status, Fatty Acid Composition and Phenolic Compounds of Carob (*Cératonia siliqua L*)", (2013).
175. Maza M. P., Zamora R., Alaiz, M., Hidalgo F. J., Millan I., and Vioque I., "Carob bean germ seed (*Cératonia siliqua L*). study on the oil and proteins", *J.of the sci.of food.and agric.* 46, (1989),495-502.
176. Tlili N., Sakouhi F., Elfalleh W., Triki S., Khaldi A., "Fatty acids, total phenols, and proteins of caper, acacia, cactus, and carob seed", *asiatic J.biotechnol. ressour.* 2, (2011),384-390.
177. Bada J.C., Leon-Camacho M., Prieto, M., Alonso L., "Characterization of oils of hazelnut from asturias", *spain.eur. J.lipid.sci.technol.* 106, (2004), 294-300.
178. Kemal-Eldin A., Andersson R .A., "A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils", *J. Am.Oil Chem. Soc.* 74, (1997), 375–380.
179. R., Smith C., "Occurrence of unusual fatty acids in plants", In: Holman, R.T. (Ed.), *Progr. Chem. Fats Other Lipids*, vol. VI. Pergamon Press, Oxford, UK, pp. (1970), 137–177.
180. Prakash D., Upadhyay G., Brahma N., Singh H. B., " Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*)", *Food Chemistry.* 104, (2007), 783-790.

181. Ruhfruhwirth G. O., Wenzl T., El-Toukhy R., Wagner F. S., & Hermetter A., "Fluorescence screening of antioxidant capacity in pumpkin seed oils and other natural oils", *européan journal of lipid science and technology*, 105, (2003), 266-274.
182. Zhang S., Zu Y. G., Fu Y. J., Luo M., Liu W. and Li J., "Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from yellow horn (*xanthoceras sorbifolia bunge*) and its anti-oxidant activity", *bioresource technology*, 101, (2010), 2537-2544.
183. Jiao J., Zhu-G.L., Qing-Yan G., Xiao J L, Fu Y. W., Yu-Jie F., Wei M., "Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities", *Food Chemistry* 147, (2014), 17–24.
184. Giordano E. F., and Visioli., " Long-chain omega 3 fatty acids: molecular bases of potential antioxydant actions, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty acids", 90, (2014), 1-4.
185. Rezig L., Chouaibim., Msaada K., Hamdi S., "Chemical composition and profile characterization of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil", *ind.crop,prod.* 37, (2012), 82-87.
186. Tasioula-Margari M., Okogeri O., "Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC-MS", *journal of Food Science*, 66, (2001), 530-534.
187. Ramadan M.F., Kroh L.W., Mörsel J.T., "Adical scavenging activity of black cummin (*Nigella sativa* L) coriander (*Coriandrum sativum*) and niger (*Guizotia abyssinica* css) crude seeds oils and oil fractions", *Journal of agricultural and food chemistry*. 51, (2003), 6961-6969.
188. Ni Q., Gao Q., Yu W., Liu X., Xu G., Zhang Y., "Supercritical carbon dioxide extraction of oils from two *Torreya grandis* varieties seeds and their physicochemical and antioxidant properties", *LWT Food Science and Technology*, (2014), 1-9.
189. Djenane D., Sánchez-Escalante A., Beltrán J.A., et Roncalés P., " Ability of a Tocopherol, taurine and rosemary in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere", *Food Chemistry*. 76, (2002), 407-415.

190. Bouzouita N., Kachouri F., Benhalima M., et Chaabouni M., "Composition chimique et activités: antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*", Journal de la Société Chimique de Tunisie, 10, (2008), 119-125.
191. Djenane D., Yangüela J., Montañés L., DJerbal M., & Roncalés P., "Antimicrobial activity of *pistacia lentiscus* and *satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media, efficacy and synergistic potential in minced beef", Food control, 22, (2011), 1046-1053.
192. Gołebiowski M., Urbanek A., Oleszczak A., Dawgul M., Kamysz W., Bogus M I., Stepnowski P., "The antifungal activity of fatty acids of all stages of *Sarcophaga carnaria* L. (Diptera: sarcophagidae)", microbiological research, 169, (2014), 279-286.
193. Dilika F., Bremner P.D., Meyer J.J.M., "Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum* : a plant used during circumcision rites", short report. Fitoterapia, 71, (2000), 450-452.

APPENDICES

APPENDICE A

Réactifs, produits chimiques et consommables :

- Acide sulfurique.
- Eau oxygénée.
- Eau distillée.
- Hydroxyde de sodium.
- Hydroxyde de potassium.
- Acide borique.
- Phénol.
- Ether de pétrole.
- Hexane.
- Méthanol.
- Ethanol.
- Ether.
- Phénolphtaléine.
- Acide chlorhydrique.
- DPPH.
- Vitamine E.
- Eau physiologique stérile 0.9%.
- Tween 80.
- Boîtes de pétri.
- Pipettes pasteurs.
- Disque de papier Wattman N°3
- Pince métallique.
- Papier filtre.

Milieux de culture :

- Muller Hinton.
- Gélose nutritive.

Appareils :

- Broyeur type Retsch Muhl.
- Tamis de 250µm.
- Etuve.
- Balance de précision.
- Four à moufle.
- Minéralisateur Kjeldahl.
- Unité de distillation type Velp-scientifica UDK 127.
- Spectrophotomètre.
- Appareil à soxhlet.
- Plaque chauffante.
- Evaporateur rotatif.
- Appareil CGMS.
- Micropipette.
- Refractomètre.
- Vortex.
- Bain marie.
- Autoclave.
- Pied à coulisse.
- Appareil photo.

Verrerie :

- Creusets en verre.
- Capsules en porcelaine.
- Dessiccateur.
- Fiole de 100, 250, 500ml.
- Tube en verre.
- Cuve en quartz.
- Pipettes de 1, 5, 10 ml.
- Creuset filtrant N°3.
- Spatule métallique.
- Ballon de 100 et 500ml.
- Réfrigérant à reflux.

APPENDICE B

Le catalyseur est préparé en mélangeant :

- 20g de sulfate de potassium (K_2SO_4).
- et 1g d'oxyde de mercure (HgO).

APPENDICE C

L'indicateur de TASHIRO :

Mélanger 10ml de méthyle rouge à 0.03% dans l'éthanol 70% et 1.5ml de bleu de méthylène à 0.1% aqueux.

APPENDICE D

Afin de tracer la courbe d'étalonnage, on suit les étapes suivantes :

- Une solution mère de α D (+) glucose est préparée à une concentration de 1%. A partir de cette dernière, on prend 1ml et on ajuste le volume par l'eau distillée jusqu'à 100ml.
- Ensuite, on prépare des dilutions de différentes concentrations: 10, 25, 40, 60, 75 et 100 ($\mu\text{g/ml}$).
- De chaque concentration, on prend 1ml auquel on ajoutera 1ml de phénol à 5% et 5ml d'acide sulfurique à 98%.
- On maintient les tubes dans une étuve pendant 5min à 105°C , ensuite on les laisse à l'obscurité pendant 30min.
- Enfin, on lit la densité optique, de chaque concentration, à 490nm et on trace la courbe d'étalonnage $DO = f(C)$.

Dont:

C: est la concentration en $\mu\text{g/ml}$

DO: est la densité optique

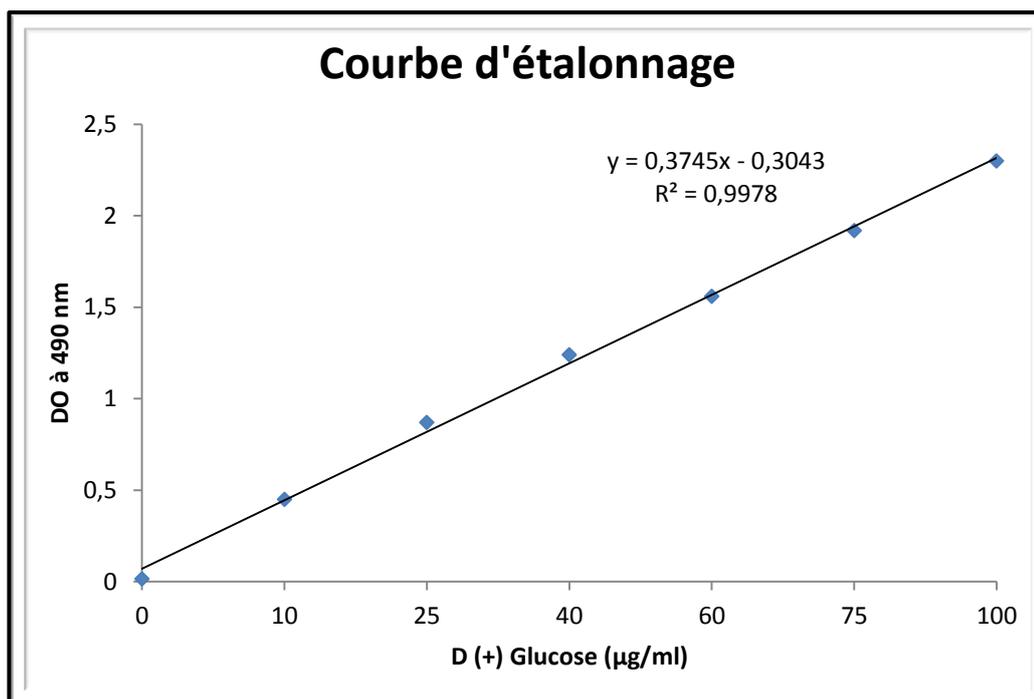


Figure : La courbe d'étalonnage.

APPENDICE E

		H%	C%	protéine	sucres totaux	MG	NDF	ADF	HEM	CELL	LIG
Graines	E1	5,09	4,2	19,065	30,07	1,81	27,32	14,36	13,05	1,97	0,2
	E2	6,96	4,9	18,91	31	1,81	26,71	14,56	14,00	1,93	0,2
	E3	6,73	4,82	19,77	30,1	1,84	29,01	14,7	12,37	2,07	0,23
Pulpe	E1	9,06	3,3	7,84	51,5	1,00	50,64	41,88	7,26	12,06	9,76
	E2	8,94	3,35	7,87	51,67	1,01	48,9	41,6	7,15	11,8	9,89
	E3	9,3	3,36	7,93	51,54	1,08	49,56	41,74	9,47	11,2	10,17

APPENDICE F

Résultats de l'analyse statistique

Analysis of Variance: Teneur en eau						
Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P	
FRUIT\$	12.098	1	12.098	22.540	0.009	
Error	2.147	4	0.537			

Analysis of Variance: Teneur en cendres						
Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P	
FRUIT\$	2.548	1	2.548	34.471	0.004	
Error	0.296	4	0.074			

Analysis of Variance: Teneur en protéines						
Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P	
FRUIT\$	193.859	1	193.859	1827.058	0.000	
Error	0.424	4	0.106			

Analysis of Variance: Teneur en sucres totaux						
Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P	
FRUIT\$	672.889	1	672.889	4685.854	0.000	
Error	0.574	4	0.144			

Analysis of Variance: Teneur en matière grasse					
Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
FRUIT\$	0.936	1	0.936	851.045	0.000
Error	0.004	4	0.001		

One-way ANOVA					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	4269,32	1	4269,32	55,66	0,0175
Within groups:	153,402	2	76,7012		
Total:	4422,72	3			

Levene's test for homogeneity of variance, based on means: p(same) = 3,688E-30
Based on medians: p(same) = 3,688E-30

Welch F test in the case of unequal variances: F=55,66, df=1,509, p=0,03596

Tukey's pairwise comparisons:
Q \ p(same)

	AGS	AGI
AGS		0,01777
AGI	10,55	

One-way ANOVA					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	13,69	1	13,69	0,00621	0,9444
Within groups:	4409,03	2	2204,51		
Total:	4422,72	3			

Levene's test for homogeneity of variance, based on means: p(same) = 1,355E-31
Based on medians: p(same) = 1,355E-31

Welch F test in the case of unequal variances: F=0,00621, df=1,781, p=0,9451

Tukey's pairwise comparisons:
Q \ p(same)

	graine	pulpe
graine		0,9445
pulpe	0,1114	

APPENDICE G

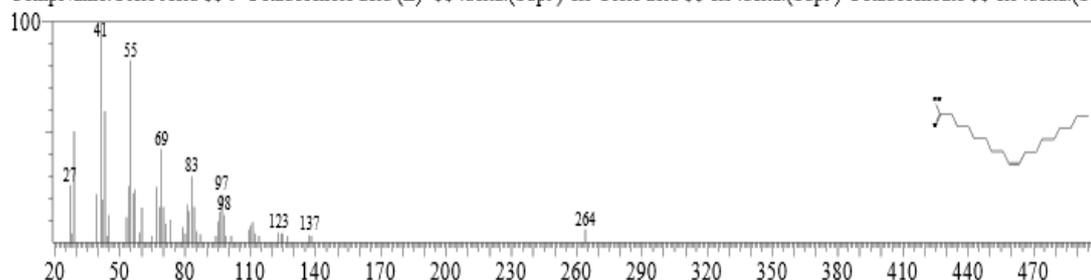
Tableau : Pourcentage des différentes fractions des fibres de caroube.

	Pulpe	Graines
NDF	49,7±0.87	27,68±1.19
ADF	41,74±0.14	14,54±0.17
Hémicellulose (1)	7,96±1.03	13,14±0.81
Cellulose (2)	11,92±0.44	1,99±0.07
Lignine (3)	9,94±0.2	0,21±0.01
Fibres insolubles	29.82	15.34

NB : (1) +(2) +(3)= les fibres insolubles.

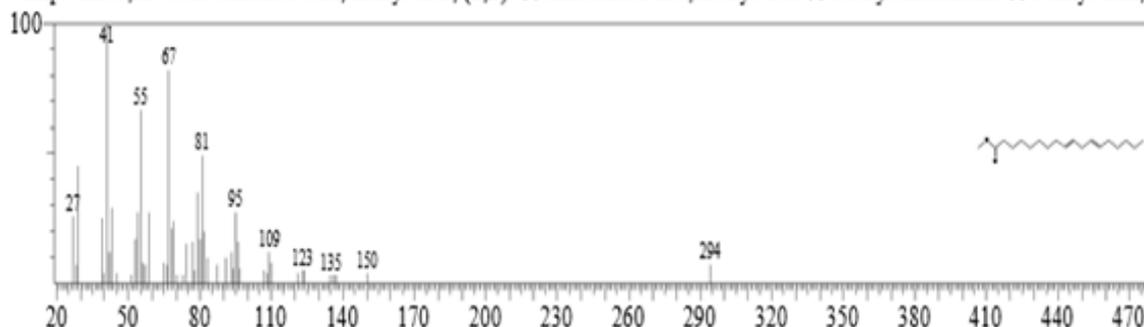
APPENDICE H

Hit#:2 Entry:66048 Library:NIST107.LIB SI:88 Formula:C18H34O2 CAS:112-80-1 MolWeight:282
CompName:Oleic Acid \$\$ 9-Octadecenoic acid (Z)- \$\$.delta.(Sup9)-cis-Oleic acid \$\$ cis-.delta.(Sup9)-Octadecenoate \$\$ cis-.delta.(Sup



Spectre de masse de l'acide oléique de l'HVg

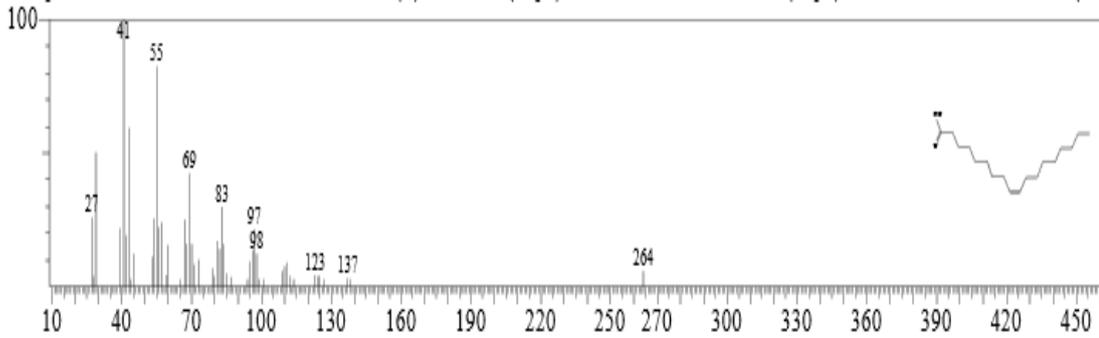
Hit#:1 Entry:69887 Library:NIST107.LIB SI:93 Formula:C19H34O2 CAS:2566-97-4 MolWeight:294
CompName:9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)- \$\$ Linolelaidic acid, methyl ester \$\$ Methyl linolelaidate \$\$ Methyl trans,trans



Spectre de masse de l'acide linoléique de l'HVg

APPENDICE I

Hit#:4 Entry:66048 Library:NIST107.LIB SI:84 Formula:C18H34O2 CAS:112-80-1 MolWeight:282
CompName:Oleic Acid \$\$ 9-Octadecenoic acid (Z)- \$\$.delta.(Sup9)-cis-Oleic acid \$\$ cis-.delta.(Sup9)-Octadecenoate \$\$ cis-.delta.(Sup



Spectre de masse de l'acide oléique de l'HVp

APPENDICE J

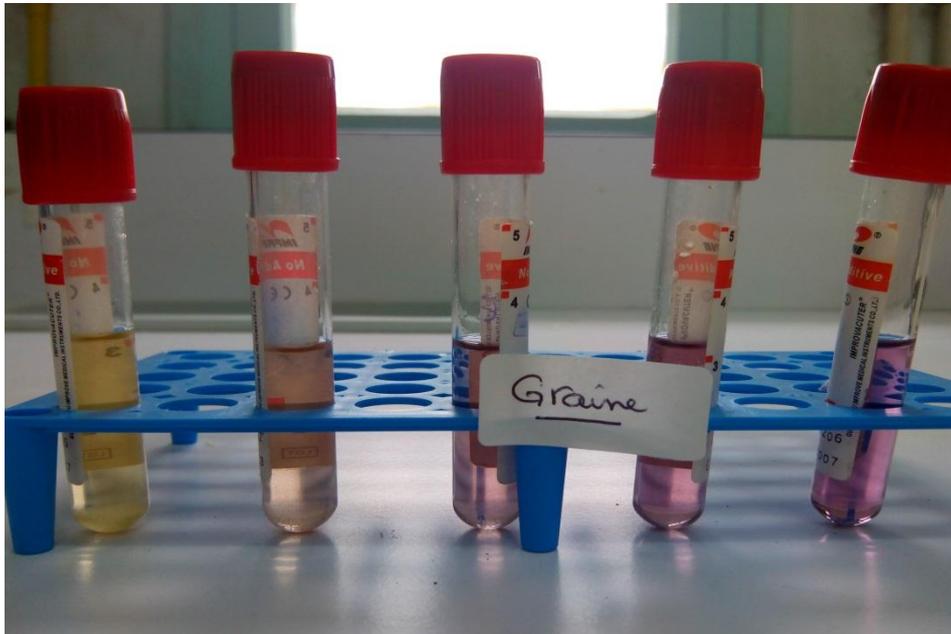


Photo de l'activité antioxydante de l'huile des graines.

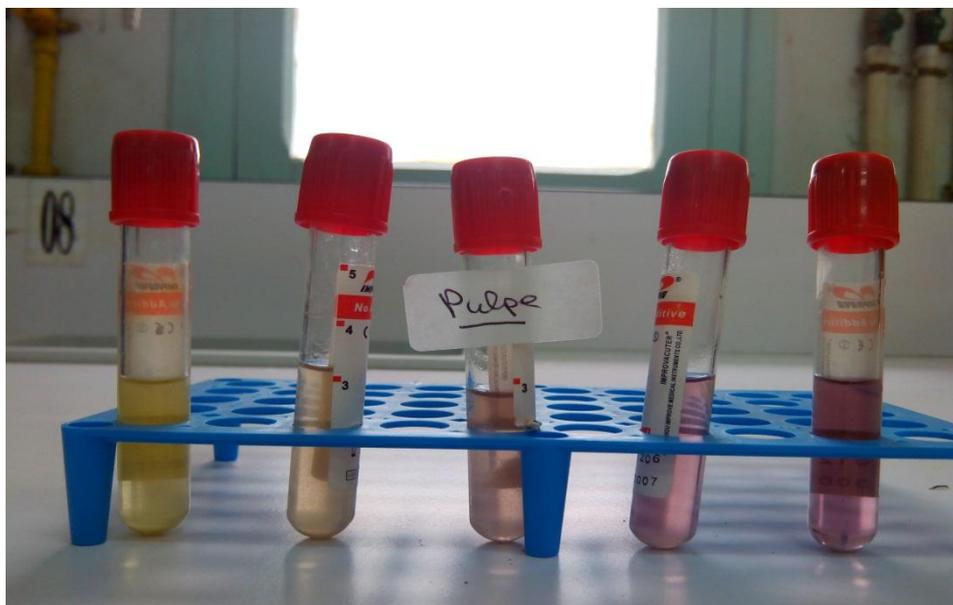


Photo de l'activité antioxydante de l'huile de pulpe.