

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Ré...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/21

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

LAKHAL Mohamed

Thème

**Étude des activités biologiques d'un polysaccharide
extrait de graines du caroubier (*Ceratonia Siliqua L.*).**

Soutenu le : 14 / 07/ 2021

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom		Grade	
M. LEKBAL Farouk	MAA	Univ. de Bouira	Président
M. TIGHLET Karim	MAA	Univ. de Bouira	Examineur
M.DAHMOUNE Farid	professeur	Univ. de Bouira	Promoteur
Mme. DJELLAL Samia	Doctorante	Univ. de Bouira	Co-Promotrice

Année Universitaire : 2020/2021

REMERCIEMENTS

Au nom de Dieu le tout puissant, et le salut sur le prophète Mohamed messenger de Dieu, que la paix soit sur lui.

Avant tout, Je remercie Dieu de nous avoir donné la force, le courage et la persistance pour accomplir ce modeste travail, Car l'homme propose mais Dieu dispose, seigneur, veuillez toujours diriger nos pas.

*Ce mémoire n'aurait jamais été entrepris ni achevé sans la patiente assistance et les conseils et orientations, les méticuleux contrôles et suivis de notre promoteur, **Monsieur DAHMOUNE Farid** et ma co-promotrice, **Mme DJELLAL Samia** Nous lui témoignons ici, de notre gratitude et notre reconnaissance.*

*Je tiens à remercier les membres de jury **M^r LEKBAL farouk** et **M^r TEGHILT Karim**, pour L'honneur qu'ils nous ont fait en*

Acceptant d'être présents et de consacrer de leur temps à la lecture et l'appréciation de ce document.

*Je remercie particulier **M. MAIZ Mohamed Yacín** et l'équipe de laboratoire de département SNV pour leurs encouragements, leurs aides scientifiques et le temps précieux qu'il nous a accordé pour mener à bien notre travail.*

Mohamed

Dédicaces

Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve...

*À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, **ma mère***

*À l'école de mon enfance, qui a été mon ombre durant Toutes les années de mes études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger, **mon père***

Aucune dédicace, ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte, Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir, Puisse Dieu, vous procure santé, bonheur et longue vie

À mon adorable sœur Oum Elkhîr, À mes frères Youcef, Mustafa, Abd Errehman, Maseoude, Abd Elmadjid, Abd Ennour.

À tout(es) mes amis(es) en particulière Samir, Fatteh, Nahî, Yacine, Mohamed big, Hamza, Ayoub, Sid ahmed, Youcef, Rochdi, Faiza , CHaima, Nahed, Kahina, Sabrina, Nawal, Nadjwa.

À tous ceux qui m'aiment

*À tous ceux que j'aime, **Je** dédie ce modeste travail.*

Mohamed

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I : Rappel sur <i>Ceratonia siliqua</i> L.	
I.1.Etymologie.....	3
II. Taxonomie	3
III. Description botanique.....	3
IV. Répartition géographique	4
V. L'utilisation de caroubier	6
V.1. L'utilisation alimentaire	6
V.2. Utilisation thérapeutique de caroubier	6
V.2.1 Traitement de la diarrhée.....	6
V.2.2 Traitement de l'hypercholestérolémie	6
V.2.3 Traitement du reflux gastro-œsophagien.....	6
Chapitre II: les polysaccharides	
I. Généralité sur les polysaccharides	8
II. La gomme de caroubier	8
II.1. Structure de galactomannane	8
II.2. Comportement Rhéologique.....	9
III. Activités biologiques des polysaccharides extrait de caroube	10
III.1. Activité antioxydant	10
III.1.1. Les antioxydants.....	10
III.1.2. Les radicaux libres	10
III.1.3. Mécanisme antioxydant.....	10
III.2. Activité anti-inflammatoire	11
III.2.1. Anti-inflammatoires	11
III.2.2. Mécanismes d'action des anti-inflammatoires.....	11

III.3. L'activité anti-hémolytique	12
III.3.1. Action anti-hémolytique.....	12
Chapitre III : Matériel et méthodes	
I. Matière première et procédures d'extraction	14
I.1. Préparation de la gomme de caroube brute.....	14
I.2. L'extraction et purification du galactomannane	14
II. Rendement d'extraction de polysaccharide	16
III. Propriétés physicochimiques de la poudre de gomme de caroube.....	16
III.1. Mesures de solubilité.....	16
III.2. Activité émulsifiante	16
III.3. Capacité de rétention d'eau (WHC) et la capacité de rétention d'huile (OHC).....	17
IV. Dosage des protéines.....	17
IV.1. Détermination des protéines.....	17
V. Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i> de caroubier.....	18
V.1. Etude de l'activité antioxydante de l'extrait polysaccharidique de caroubier par le radical DPPH ⁺	18
V.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	19
V.2.1. L'activité antihémolytique <i>in vitro</i>	19
V.2.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	20
Chapitre IV : Résultats et discussion	
I. Rendement d'extraction de polysaccharide	22
II. Propriétés physicochimiques de la poudre de gomme de caroube	23
II.1. Mesures de solubilité	23
II.3. Activité émulsifiante	24
II.4. Capacité de rétention d'eau et la capacité de rétention d'huile	24
V. Les activités biologiques	26
V.1. Etude de l'activité antioxydante.....	26
V.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	27
V.2.1. L'activité antihémolytique	27

V.2.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	28
Conclusion.....	31
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

BSA : Albumine sérique bovine

DPPH : 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

HB : Hémoglobine

I%: Pourcentage d'inhibition

LBG: Locuste Bean gum

LDL: Low density lipoproteins

Man/Gal: Mannose/galactose

NK: Naturel killer

OHC : La capacité de rétention d'huile

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBC : Cholangite biliaire primitive

PN : Polymorphisme nucléotidique

WHC : La capacité de rétention d'eau

Listes des tableaux

Tableau 1: Ratios Mannose/ Galactose des principales légumineuses..... 9

Liste des figures

Figure 1: Coupe transversale d'une graine de caroube4

Figure 3: Distribution du caroubier dans le monde.....5

Figure 4: Structure des galactomannanes de la gomme de caroube.....9

Figure 5: Aspect de matière primaire prise au laboratoire..... 14

Figure 6: Schéma du processus d'extraction et de purification de la gomme de caroube avec quelques modifications..... 15

Figure 7: Rendement d'extraction des polysaccharides22

Figure 8: Pourcentage de solubilité aqueuse en fonction de température23

Figure 9: Pourcentage d'activité émulsifiante.....24

Figure 10: Capacité de rétention de l'eau et d'huile25

Figure 11: Pourcentage des protéines dans la gomme de caroube25

Figure 12: Pourcentage d'inhibition de l'activité anti-radicalaire.....26

Figure 13: Effet des polysaccharides de *Ceratonia siliqua* L sur la stabilisation des globules rouges induit par solution hypotonique.27

Figure 14: L'effet de polysaccharides de LBG sur la dénaturation des protéines (BSA).28

Introduction

Introduction

Dans le monde, les plantes ont toujours été utilisées dans la médecine traditionnelle. Les médicaments à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. Les industries pharmaceutiques sont de plus en plus intéressées par l'étude ethnobotanique des plantes (Didier *et al.*, 2011)

En effet, en 2002, l'OMS estime que, pour se soigner, 80 % de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales. Ces espèces végétales d'aussi grande importance pour la santé des populations méritent d'être étudiées scientifiquement pour leur meilleure utilisation. Ce d'autant plus que la flore d'Algérie est riche et variée, mais demeure très peu exploitée scientifiquement. Par ailleurs, beaucoup de plantes sont très connues pour leurs grandes potentialités métaboliques de substances dites secondaires. Ces composés sont synthétisés dans les différentes parties de la plante (racines, tige, feuilles...). Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont métabolisées, ces substances sont extrêmement complexes du point de vue structure et composition chimique. Toutefois, leur métabolisme produit des milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement sont responsables de l'effet thérapeutique (Guerdouh & Roula, 2020)

Le caroubier connu sous le nom scientifique *Ceratonia siliqua* L., appartient de famille des Fabaceae (légumineuses), d'origine méditerranéenne (Ait Chitt *et al.*, 2007). La caroube est un remède naturel qui s'avère efficace pour lutter contre le cholestérol, les diarrhées aiguës infantiles, la tuberculose pulmonaire, les troubles digestifs et même certains types de cancer dont il ralentirait la progression (Berrougui, 2007). De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites primaires dans le caroubier comme les polysaccharides qui joue le rôle de principes actifs largement utilisés en pharmacopée traditionnelle (Brudieux, 2007).

Les polysaccharides sont les macromolécules les plus abondantes dans les graines végétales de caroubier. Ces macromolécules forment un groupe diversifié de glucides et peuvent être classés selon : leur origine c'est-à-dire animale ou végétale, leur nature soit de réserve ou structurel, leur solubilité dans l'eau ou leur digestion dans le système gastro-intestinal humain (Patterson., 2008). ils sont caractérisées par leurs utilisations dans les industrie agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique (Biner *et al.*, 2007).

Ce travail s'insère dans le cadre du programme destiné à la valorisation de la flore algérienne, par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs à débouchés thérapeutiques. La sélection de l'espèce est basée essentiellement sur l'endémisme et l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle en vue d'une investigation biologique. Ainsi, le présent travail s'articulera en trois grandes parties :

- Dans la première partie, nous avons commencé par une étude bibliographique qui est consacré à la description botanique de la plante et aux propriétés biologiques de *Ceratonia siliqua* L. et quelque généralité sur la gomme de caroube.
- La deuxième partie traitera la description du matériel et des méthodes utilisées, d'où nous nous sommes fixés plusieurs objectifs à savoir :
 - L'extraction des polysaccharides par la méthode d'ultrason ;
 - L'évaluation de l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et antihémolytique des extraits de la gomme de caroube ;
- Enfin, dans la troisième partie, nous avons rapporté les résultats obtenus.

Revue bibliographique

**Chapitre I : Rappel sur caroubier (*Ceratonia*
Siliqua L)**

I.1. Etymologie

Ceratonia siliqua vient du mot grec “Keras”, qui signifie petite corne tandis que le nom d’espèce “Siliqua” désigne en latin une siliqua ou gousse, on se désignant à la dureté et la forme de la gousse (Albanell *et al.*, 1990). Il est aussi appelé al-kharroube en arabe, tislighwa de Tamazight, figuier d’Egypte, fève de Pythagore (Rejeb, 1995).

II. Taxonomie

D’après Quézel and Santa (1962) la classification de *Ceratonia siliqua* L est représentée comme suit :

Règne : Plantae.

Sous-règne : Tracheobionta.

Division : Magnoliophyta.

Classe : Magnoliopsida.

Sous-classe : Rosidae.

Famille : Fabaceae.

Ordre : Fabales.

Genre : *Ceratonia*.

Espèce : *Ceratonia siliqua*.L

III. Description botanique

Le caroubier est un arbre ou un arbuste sclérophylle qui peut atteindre une hauteur de 7 à 20 m et une circonférence du bas du tronc est de 2 à 3 m. Une fois plantée, son écorce est lisse et grise Jeune et brun, rugueux à l’âge adulte, son bois rougeâtre est très dur et peut survivre Jusqu’à 200 ans (Ait Chitt *et al.*, 2007; Rejeb *et al.*, 1991).

Les graines de caroube (Figure 01) sont constituées de trois éléments : les téguments, la radicule et l’endosperme. Les téguments sont une enveloppe résistante de couleur brune (Dakia *et al.*, 2008; Dakia *et al.*, 2007). Cette coque représente 30 à 35 % du poids sec de la graine (Neukom, 1988). Au centre de la graine se trouve une radicule (ou embryon). Elle représente entre 15 et 30 % du poids sec de la graine (Neukom, 1988). L’endosperme se trouve entre les

téguments et la radicule. Il représente 40 à 50 % du poids de la graine et constitue la matière de base utilisée dans la fabrication de la gomme de caroube. Il s'agit de polysaccharides sont appelés galactomannanes (Daas *et al.*, 2000)

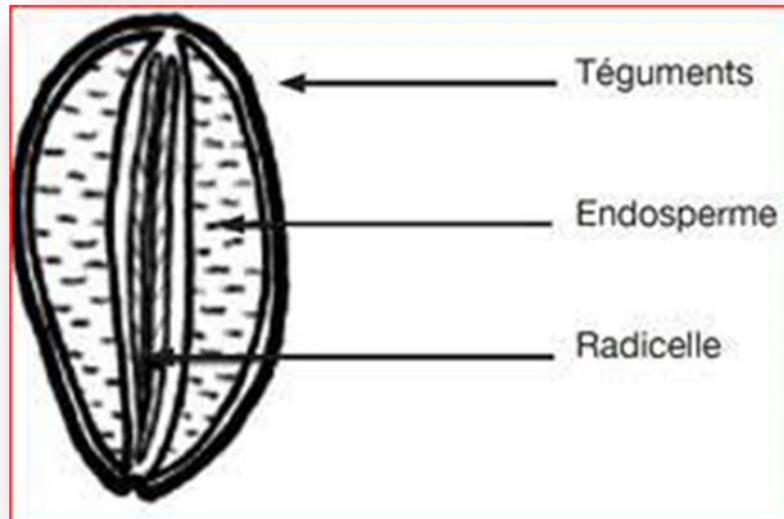


Figure 1: Coupe transversale d'une graine de caroube (Dakia *et al.*, 2008)

IV. Répartition géographique

IV.1. Dans le monde

Le caroubier s'étend dans la nature, en Syrie, Turquie, Chypre, le sud de la Jordanie, Liban, Palestine, Égypte, Arabie, Tunisie, Algérie et Libye avant d'atteindre la méditerranée occidentale (Hillcoat *et al.*, 1980). Figure 2

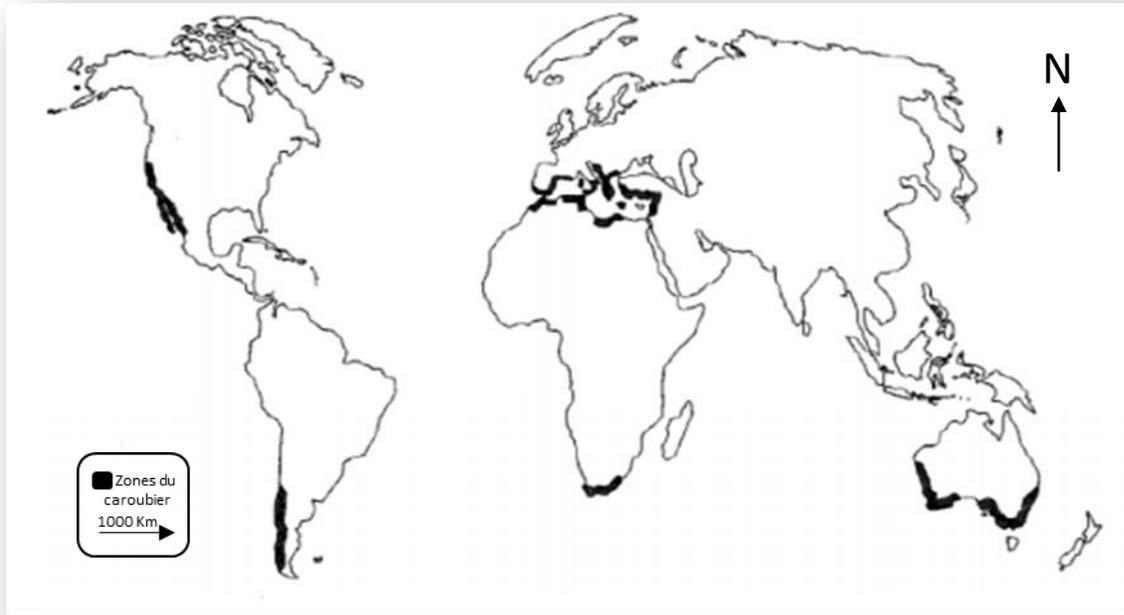


Figure 2: Distribution du caroubier dans le monde (Batlle 1997)

Généralement, la répartition de *C. silqua* et d'autres espèces d'arbres est limitée par les facteurs de stress liés au froid (Mailloux & Lavalée, 1962). est considéré comme une essence dominante et caractéristique des zones inférieures (0-500 m, atteint rarement les 900 m d'altitude) du maquis méditerranéen à feuilles persistantes (Folch *et al.*, 1981; Zohary & Orshan, 1959).

IV.2. En Algérie

En Algérie, les caroubiers sont souvent plantés dans l'Atlas du Sahara, couramment observés dans Tell (Quézel & Santa, 1962). la distribution de caroubier suivant le critère de production, se trouve dans les wilayas suivantes : Bejaia, Blida, Tipaza, Boumerdés, Ain-Defla, Bouira, Tlemcen, Mascara, Tizi Ouzou (Sallouh Mebarka)

V. L'utilisation de caroubier

V.1. L'utilisation alimentaire

La poudre de caroube tirée des gousses est un édulcorant naturel, qui a la saveur et l'apparence semblable du chocolat. L'avantage d'utiliser la caroube dans le chocolat au lieu cacao, il ne contient pas de stimulants puisqu'il est dépourvu de caféine et de théobromine (Bengoechea *et al.*, 2008).

Les gousses de caroube sont principalement utilisées pour extraire la mélasse ou «débés», qui est obtenue par broyage, trempage dans de l'eau, et par une série de décantation qui permettent d'obtenir un jus sucré. Ce jus subit une ébullition pour obtenir ce qu'on appelle la mélasse de caroube. Le tourteau de caroube broyé ou haché est aussi utilisé comme substitut de la tourbe pour les plantes en pépinière (Richardson *et al.*, 1998).

Une autre utilisation des caroubes est la fabrication d'un produit laitier artisanal connu sous le nom de « mekika ». Ce produit est préparé par coagulation du lait avec l'extrait de gousses vertes de caroube (Baumberger, 2007)

V.2. Utilisation thérapeutique de caroubier

V.2.1 Traitement de la diarrhée

Traditionnellement, la caroube est utilisée pour le traitement des affections gastro-intestinales, en particulier les diarrhées. Une étude a montré que différents types de produits à base de caroube comme le jus de caroube, réduit la durée des diarrhées et même diminue les vomissements (Hostettler *et al.*, 1995)

V.2.2 Traitement de l'hypercholestérolémie

La haute teneur en fibres de la caroube suggère qu'elle pourrait réduire le taux de cholestérol sanguin. Préparation de pulpe de caroubier de 15 g par jour et riche en polyphénols diminuait au bout de 6 semaines le profil lipidique de LDL cholestérol et triglycérides, chez des individus présentant une hypercholestérolémie (Zunft *et al.*, 2003).

V.2.3 Traitement du reflux gastro-œsophagien

Le reflux est fréquent chez les nourrissons. Une régurgitation au moins une fois par jour a été rapportée chez 77 % des nourrissons de moins de 3 mois (Nelson *et al.*, 2000). Dans les pays européens, la gomme de caroube est l'épaississant de lait le plus utilisé (Bosscher *et al.*, 2001).

Des études ont présenté que la gomme de caroube diminue considérablement le nombre d'épisodes de régurgitation (Miyazawa *et al.*, 2004), et améliore d'autres symptômes de reflux gastro-œsophagien, tels que les pleurs et les troubles du sommeil (Orenstein *et al.*, 1987).

Chapitre II : Généralités sur les polysaccharides

I. Généralités sur les polysaccharides

Les polysaccharides sont présents dans la plupart des organismes vivants, ils se trouvent dans les algues, les animaux et principalement dans les végétaux. Ils sont des polymères d'oses de très hautes masses molaires reliés entre eux par des liaisons glycosidiques. Ces molécules ont été largement étudiées et utilisées pour leurs propriétés techno-fonctionnelles dans les secteurs pharmaceutiques, cosmétiques, de l'industrie papetière, agroalimentaire, et dans l'extraction pétrolière (Liu *et al.*, 2015)

II. La gomme de caroubier

La gomme de caroube ou LBG « Locust Bean Gum » est un galactomannane, qui est un polysaccharide obtenu à partir de l'endosperme des graines après élimination de la cuticule et du germe (Kök *et al.*, 1999). La composition typique du LBG de haute pureté est de 10 à 13 % d'humidité, 5 % de protéines, 1 % de cendres, 1 % de fibres et le reste est de 80 à 85 % de galactomannane (MAIER *et al.*, 1993)

II.1. Structure de galactomannane

Le galactomannane est une hémicellulose à haut poids moléculaire située entre 30 000 et 300 000 g/mol (McCleary & Matheson, 1976; Moreira, 2008). elle est constituée de la chaîne principale de résidus D-mannopyranose reliés à β - (1 \rightarrow 4) sur lesquels se greffent des résidus D-galactopyranose sont greffés via des liaisons de type α - (1 \rightarrow 6) (McCleary & Matheson, 1976; Moreira, 2008). La structure du galactomannane est illustrée à la figure 3.

Selon la source végétale de la gomme, il existe différents galactomannanes par rapport au poids moléculaire, rapport mannose/galactose et répartition des résidus de D-galactopyranoside sur le squelette mannane (McCleary & Matheson, 1976; Moreira, 2008; Parvathy *et al.*, 2005) Le tableau 1 montre le rapport mannose/galactose de différentes légumineuses.

Tableau 1: Ratios Mannose/ Galactose des principales légumineuses (Parvathy *et al.*, 2005)

Source Ratio	Man/Gal	Référence
Schizolobium parahybum	3 : 1	Bresolin <i>et al.</i> (1997)
Mimosa scrabella	1 : 1	Bresolin <i>et al.</i> (1997)
Cyamopsis tetragonoloba (gomme de guar)	2 : 1	Parvathy <i>et al.</i> (2005)
Caeselpinia spinosa (gomme tara)	3 : 1	Parvathy <i>et al.</i> (2005)
Ceratonia siliqua (gomme de caroube)	4 : 1	Parvathy <i>et al.</i> (2005)
Trigonella foenum-graecum (gomme de fenugrec)	1 : 1	Garti <i>et al.</i> (1997)

Le rapport mannose/galactose d'une galactomannane peut être différent au sein d'une même espèce. Il dépend des conditions climatiques, de la composition du sol, la variété et de l'âge Arbre (Dakia, 2009). Il peut également être affecté par le protocole d'extraction et Purification (Sittikijyothin *et al.*, 2005).

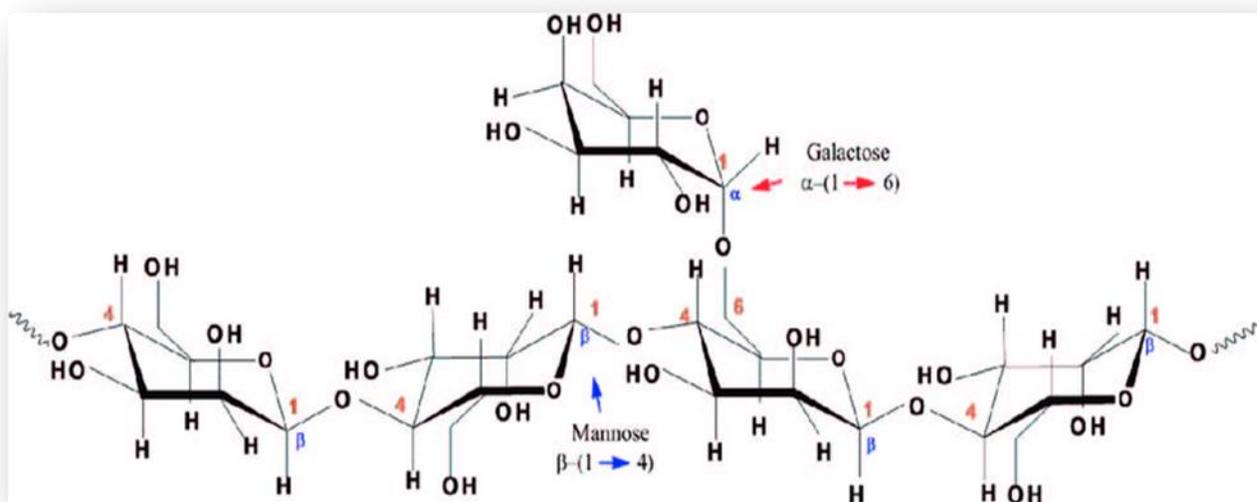


Figure 3: Structure des galactomannanes de la gomme de caroube (Sittikijyothin *et al.*, 2005).

II.2. Comportement Rhéologique

La gomme pure peut être plus sensible à la dégradation, sous l'influence de la température, que la gomme non pure car cette dernière contient des matières qui protègent le galactomannane de la dégradation. Les constituants protéiques semblent jouer ce rôle car les acides aminés sont connus pour leur forte interaction avec les petites chaînes libres qui sont impliquées dans la dégradation de la molécule sous les hautes températures (Kök *et al.*, 1999). Par ailleurs, la gomme de caroube seule ne formera jamais de gel, mais elle peut former Solution stable très visqueuse à très faible concentration (<1%), en raison de sa haute capacité de rétention d'eau (gonfler avec l'eau) (Batlle, 1997; Pollard & Fischer, 2006).

III. Les activités biologiques des polysaccharides extrait de caroube

Les polysaccharides sont des macromolécules biologiques importantes, ils se trouvent dans les plantes, les animaux et les micro-organismes, elles contiennent des activités antioxydants et anti tumorales, anti-inflammatoire ainsi que autres avantages pour la santé (Nie *et al.*, 2018)

III.1. Activité antioxydant

L'organisme dispose un complexe de défense antioxydants, pour protéger le corps contre les radicaux libres. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une exogène est apportée par l'alimentation (polysaccharides, vitamines, caroténoïdes ...) et l'autre endogène se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase...).

III.1.1. Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation pour former un composé stable (Shimizu *et al.*, 2004).

III.1.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Ce sont des espèces chimiques très instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anti cancéreux. Leur structure comprend un électron célibataire qu'ils recherchent à assembler en attaquant et en endommageant les molécules voisines (Robert *et al.*, 2009)

III.1.3. Mécanisme antioxydant

Le mécanisme d'activité antioxydante inclue :

Le piégeage direct des ERO (Espèce Réactive de l'Oxygène), l'inhibition des enzymes impliqués dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsable de la production des ERO.

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : élimination des radicaux libres chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'O₂ dans des systèmes fermés (Kebbab, 2014).

III.2. Activité anti-inflammatoire

La réaction inflammatoire est la réponse de l'organisme à une agression dont l'origine est physique (chaleur, froid, rayonnements ionisants...) ou exogène par des éléments solides (des pathogènes microbiens, des piqûres d'insecte, des produits chimiques ou biologiques) ou liée à des éléments endogènes tels que des composés issus de la réaction immunitaire (complexes immuns, anticorps cytotoxiques, cytokines...) (Zerbato, 2010). Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens comme l'aspirine. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long cours (Ndiaye, 2006)

III.2.1. Anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires permettent de lutter contre l'inflammation quelle que soit la cause de cette inflammation. Ce sont des traitements symptomatiques, c'est à dire qu'ils ne suppriment pas la cause de l'inflammation mais seulement sa conséquence. Ils ont une action également sur la douleur. Il existe deux catégories, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), et les anti-inflammatoires stéroïdiens : les corticoïdes (Segueni, 2020).

III.2.2. Mécanismes d'action des anti-inflammatoires

Un agent immunomodulateur permet de stimuler ou d'inhiber divers acteurs du système immunitaire comme les polysaccharides et de prévenir des maladies infectieuses ou cancéreuses. L'une des nouvelles tendances de la recherche dans le développement d'agents immunomodulateurs est l'identification de produits naturels présentant une toxicité faible ou tolérable dans les applications cliniques (Huang *et al.*, 2008)

Des études fait par Bruneton (2009) montre que Les polysaccharides présents dans les végétaux induisent l'agrégation plaquettaire. Certains polysaccharides sont anti-inflammatoires et présentent également des potentialités anti-tumorales (Bruneton., 2009). Puisque les polysaccharides ne peuvent pénétrer dans les cellules en raison de leur grande taille moléculaire,

Ils exercent leur action en se liant à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules Immunes telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules cytotoxiques naturelles (NK) et les lymphocytes T (Aberkhti & Ben ahmed, 2019).

III.3. L'activité anti-hémolytique

L'hémolyse selon Flatt *et al.* (2011) est un phénomène irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent leur contenu cellulaire notamment l'hémoglobine (Hb). Le degré d'hémolyse peut être régulé soit par :

- Des facteurs intracellulaires qui peuvent être : l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine.
- Des facteurs extracellulaires : tels que le plasma, l'état anatomique de l'appareil circulatoire et l'état fonctionnel du système mononuclé phagocytaire (macrophages, monocytes et leurs cellules souches).

III.3.1. Action anti-hémolytique

Ces dernières années, le domaine de la recherche scientifique investit de nouvelles substances anti hémolytiques d'origine végétale, pour remplacer les anti-hémolytiques synthétiques. Selon les études de Belkhiri *et al.* (2017) sur différentes plantes démontrent l'effet anti-hémolytique des extraits végétaux. Néanmoins, le mécanisme d'action des biomolécules composant ces extraits n'est pas encore élucidé et plusieurs hypothèses ont été émises :

Les polysaccharides, antioxydants naturels, possèdent un effet anti-hémolytique, en stabilisant la membrane des globules rouges contre la lyse osmotique (Chaudhuri *et al.*, 2007). Cette activité est effective grâce à l'attachement dans la couche externe de la membrane érythrocytaire et amélioré le manteau glycosidique, forment une protection de la cellule contre les substances toxiques en particulier les formes réactives de l'oxygène (Bonarska-Kujawa *et al.*, 2011).

De plus, les polysaccharides pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer, qui peuvent renforcer les effets oxydants par la production des radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) (Mladěnka *et al.*, 2011).

Les polysaccharides peuvent se lier à la surface de la membrane de l'érythrocyte, influant ainsi sur la position du cholestérol car l'activité anti-hypercholestérolémie (Zunft *et al.*, 2003).

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes

I. Matière première et procédures d'extraction

I.1. Préparation de la gomme de caroube brute

Les graines de caroube ont été utilisées pour la production d'une poudre appelée gomme de caroube. C'est un polysaccharide appelée galactomannane extraite de l'endosperme des graines, Elle forme une réserve de nourriture pour les graines.

Pour l'extraction du gomme brute on a suivie la méthode d'écrit par Rizzo *et al.* (2004) elle consiste à laisser gonfler les graines dans l'eau bouillante.

La séparation de l'endosperme (germe et gomme) du tégument externe a été réalisée manuellement, après le traitement des graines dans l'eau bouillante pendant 45 min puis ont été laisse dans la même eau pendant 12 h à température ambiante. Après décorticage, la gomme a été séchée à l'air libre.

La gomme sèche a été broyée avec un broyeur (Moulinex, France) puis tamisé, afin d'obtenir une poudre fine et homogène de granulométrie inférieure à 1mm.

I.2. L'extraction et purification du galactomannane

L'extraction par ultrasons a été sélectionnée dans les conditions suivantes t : 30 min T :60°C et ratio : 1/75 (mg/ml) (Choisies après une étude préliminaire).

La solution et la phase solide ont été séparées par centrifugation à 8 000 g pendant 15 min. La gomme de caroube a été précipitée avec un volume d'éthanol. Le précipité fibreux blanc formé a été recueilli par centrifugation et lavé deux fois par l'éthanol et par l'acétone. Après séchage par lyophilisateur, le précipité a été broyé en une poudre fine (Figure 4).



Figure 4: Aspect de matière première prise ou laboratoire.

Procédure de préparation d'échantillon

D'après Gillet et *al.* (2007) la procédure de préparation d'échantillon présentée comme suivant :

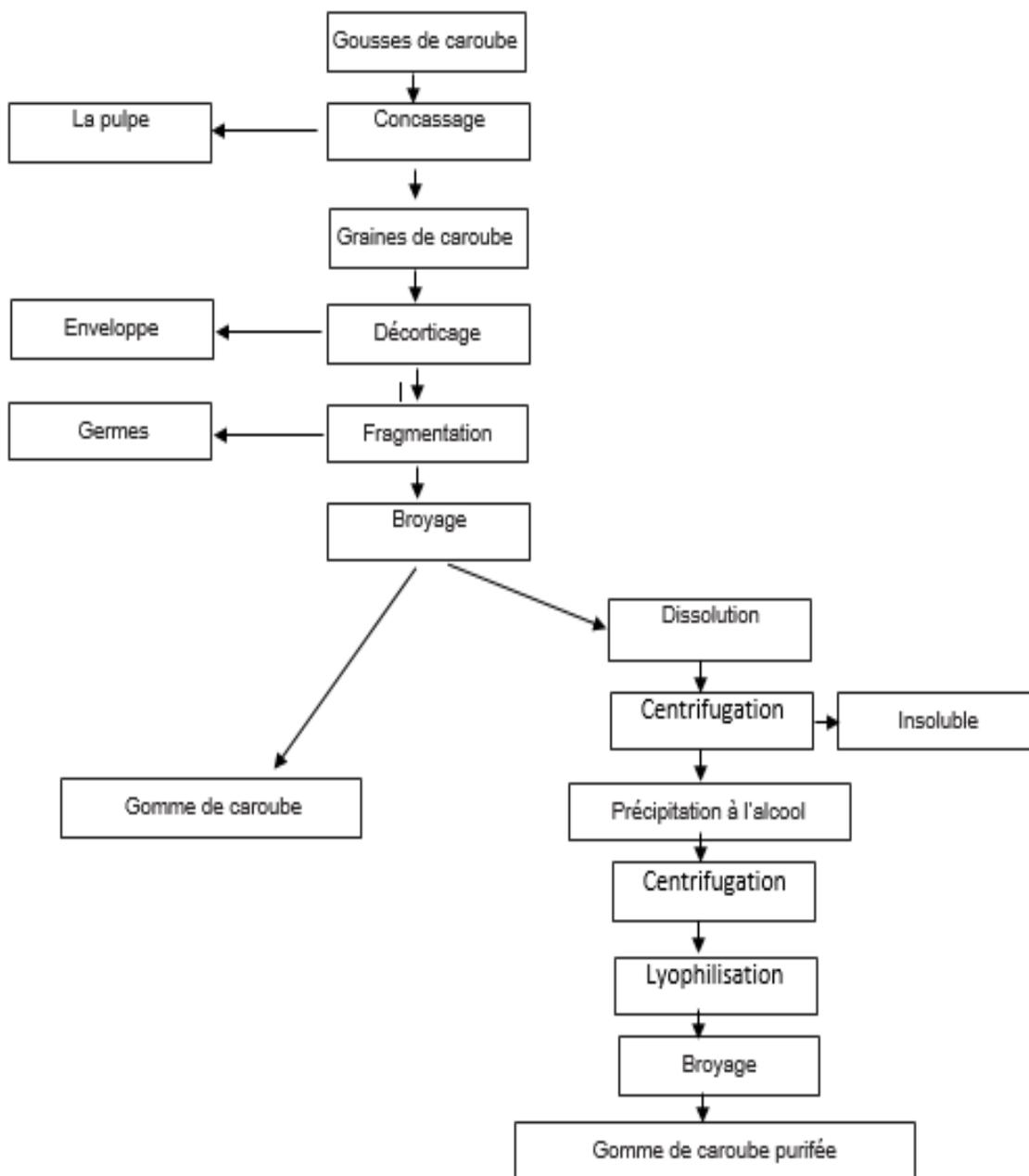


Figure 5: Schéma du processus d'extraction et de purification de la gomme de caroube avec quelques modifications.

II. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction de galactomannane a été obtenu en divisant la masse de la poudre de galactomannane séchée par la masse d'endosperme. Ce rendement est calculé par la formule :

$$R (\%) = (M/M_0) \times 100$$

R : Rendement en %,

M : Poids de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles,

M₀ : Poids de la matière végétal sec.

III. Propriétés physicochimiques de la poudre de gomme de caroube

III.1. Mesures de solubilité

La solubilité des échantillons non traités et traités à 25 et 80 ° C a été mesurée selon Dakia *et al.* (2010). La gomme extraite séchée (1%, p / v) a été mise en suspension dans de l'eau distillée suivie d'une agitation à 25 et 80 ° C pendant 30 minutes. La solution a été centrifugée à 1800 g pendant 30 minutes à 25 ° C et le surnageant a été séché à 105 ° C pendant 24 heures. Le poids du surnageant séché a été exprimé en fraction soluble

$$\text{Solubilité (\%)} = \frac{C_{\text{surnageant}} (\text{mg/ml})}{C_{\text{solut}} (\text{mg/ml})} * 100$$

$C_{\text{surnageant}}$: concentration du surnageant, C_{solut} : concentration de la préparation initiale (mg/ml)

III.2. Activité émulsifiante

Le test standard pour l'activité émulsifiante était basé sur la méthode décrite par Freitas *et al.* (2009a), utilisant de l'huile de tournesol comme substance d'essai. Brièvement, 6 ml d'huile de tournesol ont été ajoutés à 4 ml de solution aqueuse de gomme de caroube dans un tube à essai (20 mm de diamètre 180 mm) et agités dans le vortex à 2400 g pendant 5 min. Après 24 h, l'indice d'émulsification (E_{24}) a été déterminé comme suit :

$$E_{24}(\%) = \frac{h_e(\text{mm})}{h_T(\text{mm})} * 100$$

E_{24} : l'indice d'émulsification, h_e (mm) est la hauteur de la couche d'émulsion, h_T (mm) est la hauteur totale du mélange.

III.3. La capacité de rétention d'eau (WHC) et la capacité de rétention d'huile (OHC)

La méthode recommandée par Robertson et al. (2000) avec de légères modifications a été appliquée pour calculer ces paramètres. De galactomannane en poudre, 0,04 g ont été pesés puis 40 ml d'eau distillée ou d'huile de tournesol y ont été doucement ajoutés. Ensuite, les solutions ont été placées sur l'agitateur (à température ambiante) pendant environ 1 h et tourbillonnées toutes les 5 minutes. Après le temps souhaité, les solutions ont été centrifugées (3000 x g) pendant 30 minutes. Enfin, le résidu a été pesé. La capacité de rétention d'eau (WHC) et la capacité de rétention d'huile (OHC) ont été estimées en pourcentage d'eau ou d'huile détenue par gramme d'échantillon, respectivement (Robertson *et al.*, 2000).

IV. Dosage des protéines

IV.1. Détermination des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Utilisation du bleu de Coomassie et de l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard.

Principe

Il s'agit d'une technique basée sur le changement d'absorbance qui se manifeste par le changement de couleur du bleu de Coomassie après collage (complexation) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines en milieu acide, la forme anionique du bleu de Coomassie G250 interagit (par liaisons non covalentes = adsorption) avec les radicaux aromatiques des acides aminés constituant les protéines. Sa longueur d'onde d'absorption maximale passe alors de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu).

IV.2. Préparation du réactif protéique

Le bleu brillant de Coomassie G-250 (100 mg) a été dissous dans 50 ml d'éthanol à 95%. A cette solution, on a ajouté 100 ml d'acide phosphorique à 85% (p / v). La solution résultante a été diluée à un volume final de 1 litre. Les concentrations finales dans le réactif étaient de 0,01% (p / v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (p / v) d'éthanol et 8,5% (p / v) d'acide phosphorique.

Procédure

Le volume dans le tube à essai a été ajusté à 0,1 ml avec l'extrait préparé dans le tampon approprié. Puis 5 ml de réactif ont été ajoutés et le contenu a été mélangé par inversion ou vortex.

L'absorbance a été mesurée à 595 nm après 2 min et avant 1 h dans des cuvettes de 3 ml contre un blanc réactif préparé à partir de 0,1 ml du tampon approprié et 5 ml de réactif protéique.

Une gamme standard est produite à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma-Aldrich) pour une gamme de concentration comprise entre 0 et 1 g / L. A partir de cette courbe d'étalonnage, toutes les solutions inconnues de protéines exprimées en mg ou g / L sont systématiquement déterminé par extrapolation. Les extraits concentrés en protéines sont dilués pour rester dans la plage standard.

V. Evaluation des activités biologiques *in vitro* de caroubier

V.1. Etude de l'activité antioxydante de l'extrait polysaccharidique de caroubier par le radical DPPH⁺

Le DPPH⁺ (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est pratiquement le radical libre le plus stable et caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm. En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH⁺ est réduit à la forme non radicalaire jaune pâle (diminution de l'absorbance à 515 nm) (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Le test de piégeage de radical DPPH⁺ par le caroubier a été réalisé selon le protocole de (Dahmoune *et al.*, 2013). 0.1ml de solution aqueuse de l'extraits à une concentration de 1 mg/ml sont ajoutés à 3ml de la solution méthanolique du DPPH⁺ (60µM). Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 0.1ml de l'eau distillé avec 3 ml de la solution méthanolique de DPPH⁺. Les échantillons ont été incubés pendant 20 min à 37 °C dans un bain-marie, et ensuite, l'absorbance de mélange réactionnelle à 515 nm a été mesurée.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) qui est calculée selon l'équation suivant :

$$I(\%) = \frac{Abs_{contrôle} - Abs_{extrait}}{Abs_{contrôle}} * 100$$

I(%) : pourcentage d'inhibition de l'activité anti radicalaire, $Abs_{extrait}$: absorbance de

l'échantillon, $Abs_{contrôle}$: (solution du DPPH⁺ sans extrait).

V.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

V.2.1. L'activité antihymolitique *in vitro*

L'activité antihymolitique a été évalué selon le protocole de Shinde *et al.* (1999), avec de légères modifications. L'acide acétylsalicylique, Sang humain, et Solution hypotonique ont été préparé.

Pour le sang a été prélevé sur un volontaire humain en bonne santé qui n'avait pris aucun anti-inflammatoire non stéroïdienne pendant 2 semaines avant l'expérience et collecté dans du tube héparine. Le sang a été lavé trois fois avec une solution saline à 0,9% et centrifugé simultanément pendant 10 minutes à 3000 tr / min. Les cellules emballées ont été lavées avec une solution saline à 0,9% et une suspension à 40% v / v préparée en utilisant un tampon phosphate isotonique qui était composé de 154 mM de NaCl dans un tampon de phosphate de sodium 10 mM à pH 7,4 utilisé comme suspension d'érythrocytes ou de globules rouges. Concernant la Solution hypotonique : Hémolyse ou activité de stabilisation membranaire induite par la solution hypotonique.

L'échantillon de test consistait en une suspension stock d'érythrocytes (RBC) 0,030 ml mélangée à 5 ml de solution hypotonique (154 mM de NaCl dans 10 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7,4) contenant une préparation à base de galactomannane de 500 à 1000 µg / ml. L'échantillon de contrôle était constitué de 0,030 ml de suspension de RBC mélangé à une solution tamponnée hypotonique seule. Le médicament standard acétylsalicylique a été traité de la même manière que le test à des concentrations de 100 et 200 µg / ml. L'expérience a été réalisée en triple. Les mélanges ont été incubés pendant 10 minutes à température ambiante, centrifugés pendant 3 minutes à 1300g et l'absorbance du surnageant a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse ou de la stabilisation de la membrane a été calculé par l'équation suivante.

$$I_{antihymo} (\%) = \frac{A_1}{A_2} * 100$$

I_{antihymo} : pourcentage d'inhibition de l'hémolyse, **A₁** : Absorbance de la solution tamponnée hypotonique seule, **A₂** : Absorbance du test / échantillon standard dans une solution hypotonique.

V.2.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* de galactommanane a été étudiée, en utilisant le test de dénaturation des protéines d'albumine sérique bovine (BSA) selon Lekouaghet *et al.* (2020) avec légères modifications. Pour 0,5 ml de chaque concentration d'extrait ou étalon (acide salicylique), 0,5 ml de solution de BSA (0,2%) préparée dans du tampon Tris (pH 6,6) a été ajouté. Les échantillons ont été incubés dans l'étuve à 37 ° C pendant 15 min puis immergés dans un bain-marie à 72 ° C pendant 5 min. Après refroidissement des tubes, la turbidité (niveau de précipitation des protéines) a été mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre et le pourcentage d'inhibition de dénaturation des protéines a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$I_{prot}(\%) = \frac{Abs_{contrôle} - Abs_{extrait}}{Abs_{contrôle}} * 100$$

$I_{prot}(\%)$: le pourcentage d'inhibition des protéines, $Abs_{contrôle}$: absorbance de control, $Abs_{extrait}$: absorbance d'extrait

Le control représente 100% des protéines dénaturées et les résultats sont comparés à l'acide acétylsalicylique

Les analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par logiciel graphpad prisme version 8 pour effectuer le teste statistique one-way ANOVA. Les résultats considérés comme significativement différente lorsque $p < 0.005$.

Chapitre IV : Résultats et discussion

Les principaux résultats obtenus des différents tests biologiques des extraits de polysaccharides de *Ceratonia Siliqua* L. sont développés dans ce chapitre.

Résultats et discussion

I. Rendement d'extraction des polysaccharides

Cette figure montre le rendement correspond à la masse d'extrait des polysaccharides des graines de caroube après séchage. Il se rapporte à la masse initiale de l'échantillon soumis à l'extraction exprimé en pourcentage.

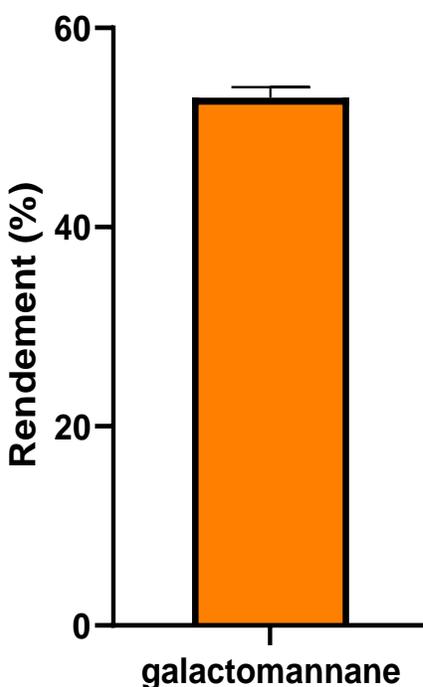


Figure 6: Rendement d'extraction des polysaccharides

L'extraction par ultrason a permis d'obtenir un bon rendement avoisinant de 53 ± 1.05 %, ce taux est élevé par rapport à celui rapporté par Blibech *et al.* (2013) 23.9 ± 2.80 % et Bouzouita *et al.* (2007) 26.7 – 33.2 %.

Le rendement d'extraction des polysaccharides dépend de la méthode d'extraction et de la purification, de la nature du solvant et varie aussi selon diverses conditions telles que :

l'environnement climatique, l'origine géographique et la période de récolte (Barbagallo *et al.*, 1997; Lazaridou *et al.*, 2001).

II. Propriétés physicochimiques de la poudre de gomme de caroube

II.1. Mesures de solubilité

La figure 7 montre les pourcentages de solubilité obtenus lors des expérimentations :

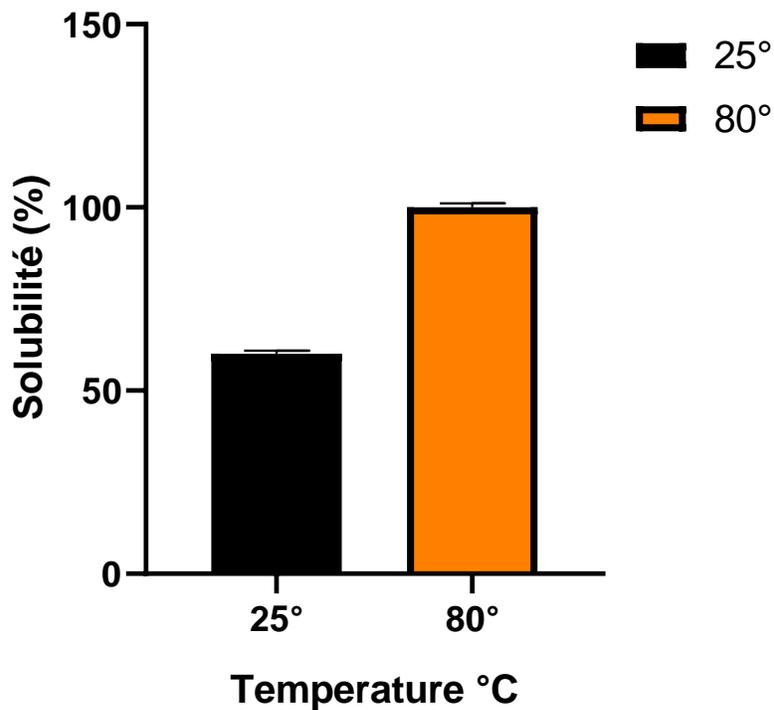


Figure 7: Pourcentage de solubilité aqueuse en fonction de température

Comme la montre figure 7, La solubilité aqueuse à l'équilibre de la gomme de caroube a été étudiée en déterminant le pourcentage de composants solubles et insolubles en fonction de la température de dissolution. Le pourcentage de solubilité était d'environ 60% à 25 °C et 100 à 80 °C. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Pollard *et al.* (2007) (50% à 51°C), et 90% à 85 °C.

La solubilité de la gomme de caroube dépendrait en partie de certains facteurs tels que la granulation de gomme de caroube (taille des particules), la température et les forces ioniques (Pollard *et al.*, 2007)

II.3. Activité émulsifiante

L'huile de tournesol montre une capacité de stabilisation de l'émulsion, avec un indice d'émulsification de $27,5 \pm 2,5\%$ est supérieur à celle obtenue par Freitas *et al.* (2009b) (20 %).

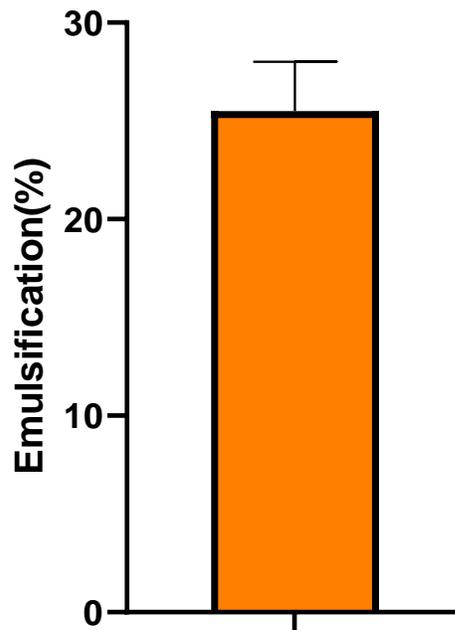


Figure 8: Pourcentage d'activité émulsifiante

Des études montre que les propriétés fonctionnelles des polysaccharides sont influencées par les propriétés structurales des polysaccharides, telles que le poids moléculaire, la teneur en acide uronique et la composition en monosaccharides (Funami *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2019).

II.4. Capacité de rétention d'eau et la capacité de rétention d'huile

La capacité de rétention d'eau est la capacité de la gomme à retenir l'eau est égale à l'humidité. la gomme de caroube avait une capacité de rétention d'eau $97,71 \pm 1,61\%$ plus élevée que celle obtenue par Blibech *et al.* (2013) $21,3 \pm 1,12\%$. La présence d'un grand nombre de groupes hydroxyles est responsable de l'absorption d'humidité dans ces structures polysaccharidiques (Naqvi *et al.*, 2011).

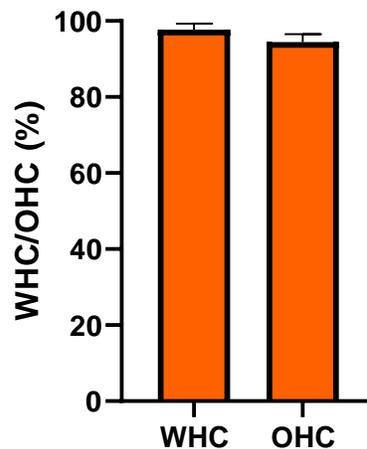


Figure 9: Capacité de rétention de l'eau et d'huile

La capacité de rétention d'huile est $94,46 \pm 2,07\%$ cette valeur est supérieure à celle trouvée par (Hussin *et al.*, 2017; Recharla *et al.*, 2017) qui ont travaillé sur les galactomannanes du palmier à sucre d'Aren. Le niveau élevé d'absorption d'huile est attribué aux molécules de gomme non polaires qui peuvent piéger les gouttelettes d'huile. Cette propriété a eu de nombreux effets sur la texture des aliments (Thanatcha & Pranee, 2011).

III. Dosage des protéines

La gomme de caroube contient des protéines qui interagissent avec les polysaccharides (la figure 10)

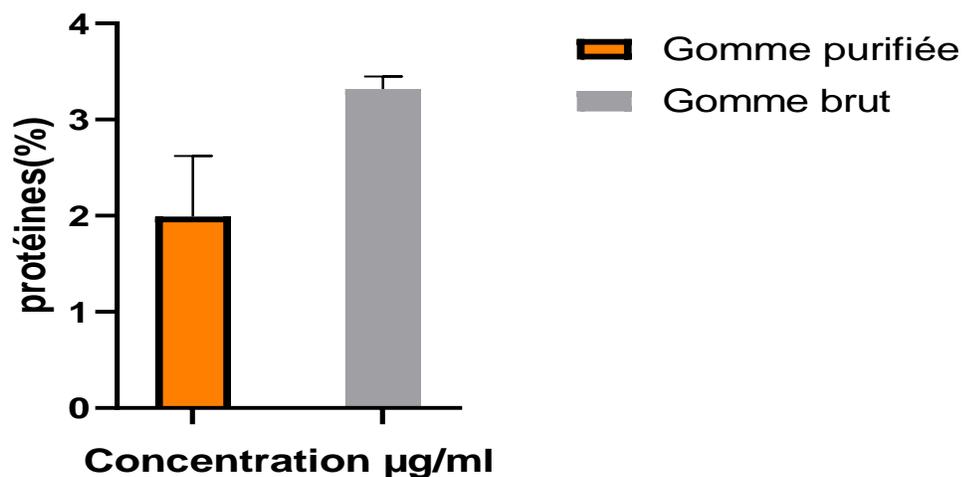


Figure 10: Pourcentage des protéines dans la gomme de caroube

Le pourcentage de ces molécules dans la gomme de caroube purifiée $1,99 \pm 0,63$ % et l'extrait brute $3,32 \pm 0,13$ % sont significativement différents, et très faible que ceux obtenue par Andrade *et al.* (1999) (4,64%) et da Silva and Gonçalves (1990) (4,66%), à cause de l'efficacité de protocole qui confère une meilleur purification.

V. Les activités biologiques

V.1. Etude de l'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de gomme de caroube a été réalisée par la technique chimique du piégeage du radical libre DPPH⁺ (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) qui est généralement le radical le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydant en raison de sa stabilité et la simplicité de l'analyse (Segueni, 2020).

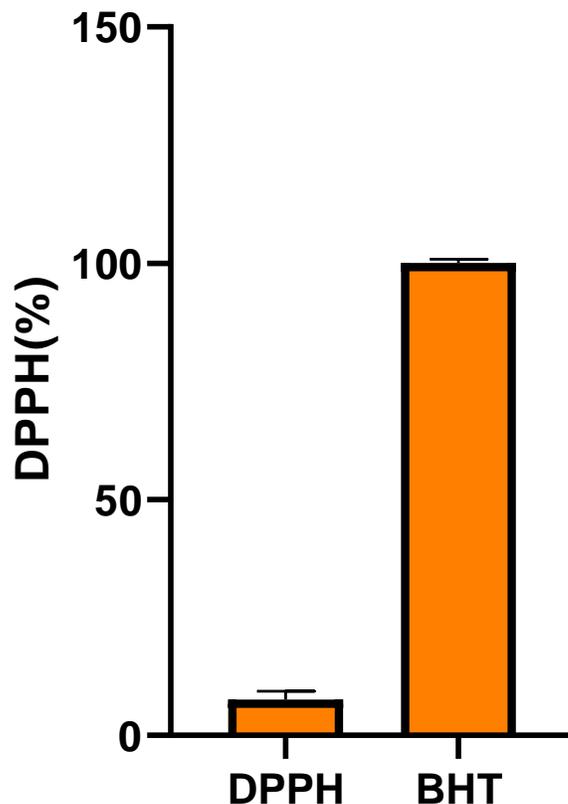


Figure 11: Pourcentage d'inhibition de l'activité anti-radicalaire

Concentration de 1mg/ml de la gomme de caroube présente une pourcentage d'inhibition de DPPH⁺ ($I\% = 7.625 \pm 1.761$ %).

Les graines de caroube ont montré un faible potentiel antioxydant qui était évalué par la méthode de DPPH⁺. Nos résultats étaient supérieurs à celle des valeurs signalées par Fidan *et al.* (2020). La différence dans les résultats pourrait être due à l'influence de facteurs environnementaux, périodes de la récolte, les conditions climatiques et l'origine des échantillons.

En fait, des études de Delattre (2005) ont confirmé l'augmentation des propriétés anti-radicalaire avec des polysaccharides oxydés. Ensuite, les groupes carboxylate ont été décrits pour leur capacité à activer l'atome d'hydrogène de l'atome de carbone anomère conduisant ainsi à augmenter leur capacité de donneur d'hydrogène

Meng *et al.* (2015) ont déclaré que les activités de piégeage des radicaux libres à une corrélation significative avec la teneur en mannose et en glucose. La teneur en galactose n'a pas été corrélée à l'activité antioxydant. Et le contenu de mannose a eu une influence positive sur l'activité, tandis que l'influence du glucose était négative (Lo *et al.*, 2011).

V.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

V.2.1. L'activité anti-hémolytique

L'activité anti-hémolytique des polysaccharides hydrosolubles de LBG est évaluée en provoquant l'hémolyse par une solution hypotonique qui induit la désorganisation de la membrane et la libération de l'hémoglobine donnant au surnageant une légère coloration rouge en fonction de la proportion d'hémolyse.

Les résultats sont représentés dans la figure 12 :

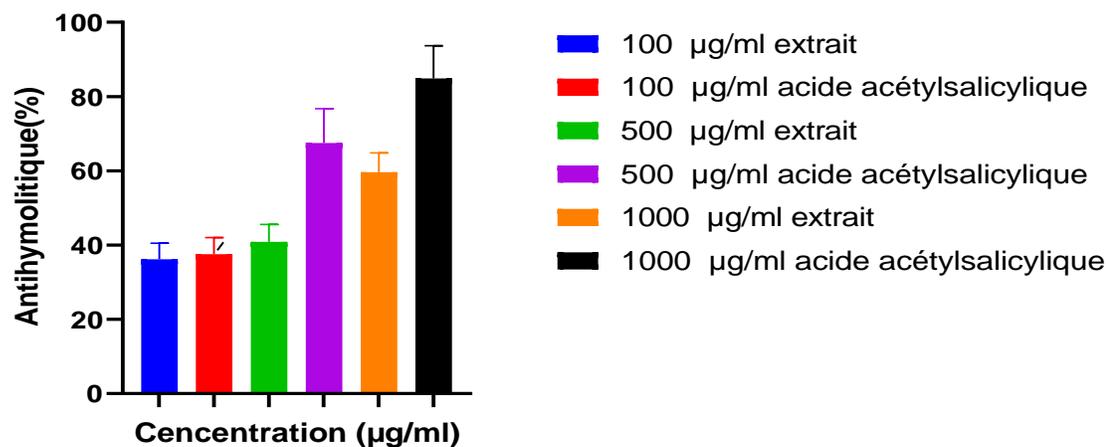


Figure 12: Effet des polysaccharides de *Ceratonia siliqua* L sur la stabilisation des globules rouges induit par solution hypotonique.

Les résultats révèlent que le polysaccharide LBG possède une activité anti-hémolytique en compare avec l'acide acétylsalicylique comme témoin, à une concentration de 1000 µg/ml de LBG montre un pourcentage de stabilisation de la membrane des globules rouges $59,64 \pm 4,23\%$ et celle de témoin $84,88 \pm 7,20\%$ ces résultats sont significativement différents ($p < 0.005$).

Le mécanisme de base d'action de ces macromolécules est supposé se produire par l'intermédiaire de la stimulation des macrophages et de la modulation du système du complément. La modulation de l'immunité innée a un impact important sur la capacité de l'hôte à répondre rapidement et puissamment à un large éventail d'agents pathogènes (Wang *et al.*, 2013). Des polysaccharides d'origine naturelle diminuent significativement l'expression des cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1 β , IL-6 et INF- γ , et peuvent aussi augmenter les cytokines anti-inflammatoires, comme IL-10 et MIP-1 β (Boukemara, 2016)

V.2.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti inflammatoire a été déterminée par la méthode d'inhibition de la dénaturation thermique des protéines, décrite par Karthik *et al.* (2013).

La figure représente la variation du pourcentage de protection vis-à-vis de la dénaturation thermique de la BSA en fonction des différentes concentrations en extrait. Ces résultats sont comparés à ceux obtenue pour l'acide acétylsalicylique, considérée comme molécule de référence.

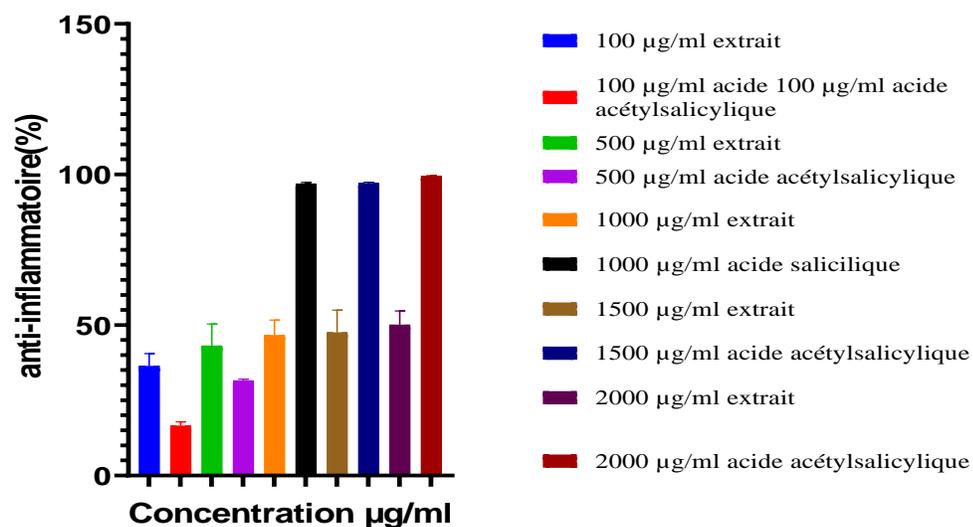


Figure 13: L'effet de polysaccharides de LBG sur la dénaturation des protéines (BSA).

Les résultats que nous avons enregistrés montrent que l'extrait exprime des pourcentages de protection allant de (36.34±3.36%, à 43.08±5.90%) avec les concentrations 100 et 500µg/ml respectivement, autant que l'acide acétylsalicylique a démontré une activité de (16.52±1.09%, à 31.54±0.37%). D'autre part à des concentrations de 1000 à 2000 µg/ml, l'extrait exprime des pourcentages de protection allant de (46.63±4.08% à 56.08±3.74) et de l'acide acétylsalicylique (96.93±0.29% à 99.53±0.05%). Ces résultats sont significativement différents ($p < 0.005$).

D'après ces résultats, l'extrait aqueux de LBG contribuerait à l'inhibition de la dénaturation des protéines. Il serait donc capable d'inhiber la production d'auto- antigènes protéiques induisant une réponse immunitaire et participant ainsi à l'entretien de l'inflammation ce qui a pour incidence de nombreuses maladies inflammatoires notamment la polyarthrite rhumatoïde (Habibur *et al.*, 2015; Sandhar *et al.*, 2011).

Conclusion

Conclusion

L'utilisation des plantes médicinales est aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue à travers le monde. Elle est considérée comme une source des matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point des futurs médicaments. Parmi ces plantes *Ceratonia Siliqua* L. qui est une plante vivante dans région méditerranéenne et qui est utilisée dans la médecine traditionnelle. L'étude de cette plante permis d'avoir des résultats importants.

L'extraction des polysaccharides de graines de caroube par ultrason a donné un bon rendement. De plus, le dosage spectrophotométrique de l'extrait aqueux des polysaccharides montre une faible activité anti radicalaire vis-à-vis du DPPH⁺, en comparons les résultats avec l'antioxydant de référence le BHT.

L'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique de l'extrait aqueux de LBG est importante, ceci nous amené à une rechercher ultérieure de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*.

Les résultats de notre étude suggèrent l'importance de l'espèce du *Ceratonia siliqua* L pour l'usage dans la pharmacie, la phytothérapie et agroalimentaire. Si l'on se fond sur cette information ont pourrait conclure que cette plante est l'une de sources naturelle des substances bioactives d'importance élevé.

Nos perspectives, des études plus approfondies seraient nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes d'action des molécules bioactives, leur dose thérapeutique ainsi que leur site d'action au niveau de la cellule. Cela permettre de préparer des produits pharmaceutiques de grande intérêt.

Listes des références

Références bibliographiques

- Ait Chitt, M., Belmir, H., & Lazrak, A. (2007). Production de plants sélectionnés et greffés de caroubier. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA MAPM/DERD*, 153, 1-4.
- Albanell, J., Salud, A., Bellmunt, J., Español, T., Morales, S., García-Bragado, F., & Solé-Calvo, L. (1990). Treatment with interferon of systemic Langerhans-cell histiocytosis in an adult. *Medicina clinica*, 94(5), 184-186.
- Andrade, C., Azero, E., Luciano, L., & Gonçalves, M. (1999). Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. *International journal of biological macromolecules*, 26(2-3), 181-185.
- Barbagallo, M. G., Di Lorenzo, R., Meli, R., & Crescimanno, F. (1997). Characterization of carob germplasm (*Ceratonia siliqua* L.) in Sicily. *Journal of Horticultural Science*, 72(4), 537-543.
- Batlle, I. (1997). *Carob tree: Ceratonia siliqua L.-Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 17 (Vol. 17). Bioversity International.
- Belkhir, F., Baghiani, A., Zerroug, M. M., & Arrar, L. (2017). Investigation of antihemolytic, xanthine oxidase inhibition, antioxidant and antimicrobial properties of *Salvia verbenaca* L. aerial part extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(2), 273-281.
- Bengoechea, C., Romero, A., Villanueva, A., Moreno, G., Alaiz, M., Millán, F., . . . Puppo, M. (2008). Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins. *Food Chemistry*, 107(2), 675-683.
- Berrougui, H. (2007). Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), une richesse nationale aux vertus médicinales. *Maghreb Canada Express*, 5(9).
- Biner, B., Gubbuk, H., Karhan, M., Aksu, M., & Pekmezci, M. (2007). Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, 100(4), 1453-1455.
- Blibech, M., Maktouf, S., Chaari, F., Zouari, S., Neifar, M., Besbes, S., & Ellouze-Ghorbel, R. (2013). Functionality of galactomannan extracted from Tunisian carob seed in bread dough. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 423-429. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0966-2>
- Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H., Oszmiański, J., Sarapuk, J., & Kleszczyńska, H. (2011). Changes caused by fruit extracts in the lipid phase of biological and model membranes. *Food biophysics*, 6(1), 58-67.
- Bosscher, D., Van Caillie-Bertrand, M., & Deelstra, H. (2001). Effect of thickening agents, based on soluble dietary fiber, on the availability of calcium, iron, and zinc from infant formulas. *Nutrition*, 17(7-8), 614-618.
- Bouzouita, N., Khaldi, A., Zgoulli, S., Chebil, L., Chekki, R., Chaabouni, M., & Thonart, P. (2007). The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food Chemistry*, 101(4), 1508-1515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.056>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brudieux, V. (2007). *Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques: application de la relation structure/activité à la dermocosmétique* Limoges].
- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). *Tec & Doc/Lavoisier, Paris*, 279-281.

- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International journal of biological macromolecules*, 41(1), 42-48.
- da Silva, J. L., & Gonçalves, M. (1990). Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food hydrocolloids*, 4(4), 277-287.
- Daas, P. J., Schols, H. A., & de Jongh, H. H. (2000). On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. *Carbohydrate research*, 329(3), 609-619.
- Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., & Madani, K. (2013). Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 50, 77-87.
- Dakia, P. (2009). *Propriétés chimiques et rhéologiques des polysaccharides de l'endosperme des graines de caroubier (Ceratonia siliqua L.)* Thèse de doctorat: Faculté universitaire des Sciences agronomiques de ...].
- Dakia, P. A., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., & Paquot, M. (2008). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food hydrocolloids*, 22(5), 807-818.
- Dakia, P. A., Wathelet, B., & Paquot, M. (2007). Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua L.*) seed germ. *Food Chemistry*, 102(4), 1368-1374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.059>
- Dakia, P. A., Wathelet, B., & Paquot, M. (2010). Influence of galactose content on interactions phenomena and on galactomannans physicochemical properties in solution. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(1), 213-223.
- Delattre, C. (2005). *Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes* [Amiens].
- Didier, D. S., Emmanuel, M. M., Alfred, N., France, K. M., & Lagarde, B. J. (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37(9), 2496-2507.
- Fidan, H., Stankov, S., Petkova, N., Petkova, Z., Iliev, A., Stoyanova, M., . . . Ercisli, S. (2020). Evaluation of chemical composition, antioxidant potential and functional properties of carob (*Ceratonia siliqua L.*) seeds. *J Food Sci Technol*, 57(7), 2404-2413. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04274-z>
- Flatt, J. F., Guizouarn, H., Burton, N. M., Borgese, F., Tomlinson, R. J., Forsyth, R. J., . . . Aguilar-Martinez, P. (2011). Stomatin-deficient cryohydrocytosis results from mutations in SLC2A1: a novel form of GLUT1 deficiency syndrome. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(19), 5267-5277.
- Folch, R., i Ràfols, E. S., & i Badia, J. N. (1981). *La vegetació dels païses catalans*. Ketres.
- Freitas, F., Alves, V. D., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, R., & Reis, M. A. (2009a). Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydrate Polymers*, 78(3), 549-556.
- Freitas, F., Alves, V. D., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, R., & Reis, M. A. M. (2009b). Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydrate Polymers*, 78(3), 549-556. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.016>
- Funami, T., Nakauma, M., Ishihara, S., Tanaka, R., Inoue, T., & Phillips, G. O. (2011). Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality. *Food hydrocolloids*, 25(2), 221-229.
- Guerdouh, S., & Roula, M. E. (2020). *Etude phytochimique et activité antibactérienne de Schinus molle L* [Université de Jijel].

- Habibur, R., Chinna, E., & Dutta, A. (2015). In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa* Var. *Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam)*. *Am-Euras. J Agric Environ Sci*, 15(1).
- Hillcoat, D., Lewis, G., & Verdcourt, B. (1980). A new species of *Ceratonia* (Leguminosae-Caesalpinioideae) from Arabia and the Somali Republic. *Kew Bulletin*, 261-271.
- Hostettler, M., Steffen, R., & Tschopp, A. (1995). Efficacy and Tolerance of Insoluble Carob Fraction in the Treatment of Travellers' Diarrhoea. *Journal of diarrhoeal diseases research*, 155-158.
- Huang, H.-P., Shih, Y.-W., Chang, Y.-C., Hung, C.-N., & Wang, C.-J. (2008). Chemoinhibitory effect of mulberry anthocyanins on melanoma metastasis involved in the Ras/PI3K pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(19), 9286-9293.
- Hussin, A., Sapawi, C., Anzian, A., & Ramli, H. (2017). Aqueous extraction, purification and characterization of galactomannans from aren sugar palm (*Arenga pinnata*) fruits. *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol*, 7(4), 1148-1154.
- Kebbab, R. (2014). *Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété Chamlal: Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation* [Université Mouloud Mammeri].
- Kök, M. S., Hill, S., & Mitchell, J. (1999). A comparison of the rheological behaviour of crude and refined locust bean gum preparations during thermal processing. *Carbohydrate Polymers*, 38(3), 261-265.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., & Izydorczyk, M. S. (2001). Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(1), 68-75.
- Lekouaghet, A., Boutefnouchet, A., Bensuici, C., Gali, L., Ghenaiet, K., & Tichati, L. (2020). In vitro evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extract and its fractions from *Leuzea conifera* L. roots. *South African Journal of Botany*, 132, 103-107.
- Liu, J., Willför, S., & Xu, C. (2015). A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 31-61.
- Liu, X., Bian, J., Li, D., Liu, C., Xu, S., Zhang, G., . . . Gao, P. (2019). Structural features, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of polysaccharides from stem of *Physalis alkekengi* L. *Industrial Crops and Products*, 129, 654-661.
- Lo, T. C.-T., Chang, C. A., Chiu, K.-H., Tsay, P.-K., & Jen, J.-F. (2011). Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 320-327.
- MAIER, H., ANDERSON, M., KARL, C., MAGNUSON, K., & WHISTLER, R. L. (1993). Guar, locust bean, tara, and fenugreek gums. In *Industrial gums* (pp. 181-226). Elsevier.
- Mailloux, N., & Lavalley, C. (1962). Genèse et signification de la conduite "antisociale". *Canadian Journal of Corrections*, 4(2), 103-111.
- McCleary, B., & Matheson, N. (1976). Galactomannan utilization in germinating legume seeds. *Phytochemistry*, 15(1), 43-47.
- Meng, L., Sun, S., Li, R., Shen, Z., Wang, P., & Jiang, X. (2015). Antioxidant activity of polysaccharides produced by *Hirsutella* sp. and relation with their chemical characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 117, 452-457.
- Miyazawa, R., Tomomasa, T., Kaneko, H., & Morikawa, A. (2004). Effect of locust bean gum in anti-regurgitant milk on the regurgitation in uncomplicated gastroesophageal reflux. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 38(5), 479-483.
- Mladěnka, P., Macáková, K., Filipský, T., Zatloukalová, L., Jahodář, L., Bovicelli, P., . . . Saso, L. (2011). In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of inorganic biochemistry*, 105(5), 693-701.

- Moreira, L. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(2), 165-178.
- Naqvi, S. A., Khan, M., Shahid, M., Jaskani, M., Khan, I. A., Zuber, M., & Zia, K. M. (2011). Biochemical profiling of mucilage extracted from seeds of different citrus rootstocks. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 623-628.
- Ndiaye, P. (2006). Questions de couleur. Histoire, idéologie et pratiques du colorisme. *De la question sociale à la question raciale*, 37-54.
- Nelson, S. P., Chen, E. H., Syniar, G. M., Christoffel, K. K., & Group, P. P. R. (2000). Prevalence of symptoms of gastroesophageal reflux during childhood: a pediatric practice-based survey. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 154(2), 150-154.
- Neukom, H. (1988). Carob bean gum: properties and applications. Proceedings of the II International Carob Symposium (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain,
- Nie, C., Zhu, P., Ma, S., Wang, M., & Hu, Y. (2018). Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce. *Carbohydrate Polymers*, 188, 236-242.
- Orenstein, S. R., Magill, H. L., & Brooks, P. (1987). Thickening of infant feedings for therapy of gastroesophageal reflux. *The Journal of pediatrics*, 110(2), 181-186.
- Parvathy, K., Susheelamma, N., Tharanathan, R., & Gaonkar, A. K. (2005). A simple non-aqueous method for carboxymethylation of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 62(2), 137-141.
- Pollard, M., Kelly, R., Wahl, C., Fischer, P., Windhab, E., Eder, B., & Amado, R. (2007). Investigation of equilibrium solubility of a carob galactomannan. *Food hydrocolloids*, 21(5-6), 683-692. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.08.010>
- Pollard, M. A., & Fischer, P. (2006). Partial aqueous solubility of low-galactose-content galactomannans—What is the quantitative basis? *Current opinion in colloid & interface science*, 11(2-3), 184-190.
- Quézel, P., & Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- Recharla, N., Riaz, M., Ko, S., & Park, S. (2017). Novel technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review. *Journal of Functional Foods*, 39, 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.001>
- Rejeb, M., Laffray, D., & Louguet, P. (1991). Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) en Tunisie. *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides, Group d'Etude de l'Arbre, Paris, France*. P, 417-426.
- Rejeb, M. N. (1995). Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration. *Quel avenir pour l'amélioration des plantes*, 79-85.
- Richardson, P. H., Willmer, J., & Foster, T. J. (1998). Dilute solution properties of guar and locust bean gum in sucrose solutions. *Food hydrocolloids*, 12(3), 339-348.
- Rizzo, V., Tomaselli, F., Gentile, A., La Malfa, S., & Maccarone, E. (2004). Rheological properties and sugar composition of locust bean gum from different carob varieties (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7925-7930.
- Robert, F., Bebin, K., Garrau, J.-M., Gueriot, J.-F., Foret, R., Brack, M., & Garrel, C. (2009). Evaluation et correction du stress oxydatif du porcelet en post-sevrage. *Journées Recherche Porcine*, 41(1), 173-178.
- Robertson, J. A., de Monredon, F. D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R., & Thibault, J.-F. (2000). Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study. *LWT-Food Science and Technology*, 33(2), 72-79.
- Sallouh Mebarka, N. I. Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques de la caroube Algérienne.
- Sandhar, H. K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., & Sharma, P. (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale pharmaceutica scientia*, 1(1), 25-41.

- Shimizu, H., Kiyohara, Y., Kato, I., Kitazono, T., Tanizaki, Y., Kubo, M., . . . Iida, M. (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke*, *35*(9), 2072-2077.
- Shinde, U., Phadke, A., Nair, A., Mungantiwar, A., Dikshit, V., & Saraf, M. (1999). Membrane stabilizing activity—a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil. *Fitoterapia*, *70*(3), 251-257.
- Sittikijyothin, W., Torres, D., & Gonçalves, M. (2005). Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, *59*(3), 339-350.
- Thanatcha, R., & Pranee, A. (2011). Extraction and characterization of mucilage in Ziziphus mauritiana Lam. *International Food Research Journal*, *18*(1).
- Wang, M., Jiang, C., Ma, L., Zhang, Z., Cao, L., Liu, J., & Zeng, X. (2013). Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of Hovenia dulcis. *Food Chemistry*, *138*(1), 41-47.
- Zerbato, M. (2010). *Intérêt du dosage par microméthode de la Protéine C Réactive au cabinet de pédiatrie UHP-Université Henri Poincaré*.
- Zohary, M., & Orshan, G. (1959). The maquis of Ceratonia siliqua in Israel. *Vegetatio*, 285-297.
- Zunft, H., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H., Koebnick, C., & Grünwald, J. (2003). Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *European Journal of Nutrition*, *42*(5), 235-242.

Résumé

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire, antihémolytique et antioxydant des polysaccharides de gomme de caroube obtenus en utilisant la technique ultrason assistée par solution. L'activité antioxydant a été évaluée par la méthode de DPPH⁺. Les résultats ont montré un faible potentiel antioxydant avec un pourcentage d'inhibition de $7.625 \pm 1.761\%$ pour une concentration de 1mg/ml. Un pourcentage de solubilité était d'environ 60% à 25 °C et 100% à 80°C. La capacité de stabilisation de l'émulsion a montré un indice d'émulsification de $27,5 \pm 2,5\%$. L'activité antihémolytique a montré un pourcentage de stabilisation de la membrane des globules rouges $59,64 \pm 4,23\%$ avec une concentration de 1000 µg/ml. Nous supposons que la gomme de caroube est une biomolécule trésor pour la santé humaine, et une très grande valeur économique et thérapeutique.

Les mots clés : *Ceratonia siliqua* L, Galactomannane, Endosperme, antioxydant, anti-inflammatoire, antihémolytique

Abstract

The aim of our study is to evaluate the anti-inflammatory, antihemolytic and antioxidant activity of locust bean gum polysaccharides obtained using solution-assisted ultrasound technique. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH⁺ method. The results showed low antioxidant potential with an inhibition percentage $7.625 \pm 1.761\%$ for a concentration of 1 mg / ml. A solubility percentage was 60% at 25 ° C and 100% at 80 ° C. The stabilization capacity of the emulsion showed an emulsification index of $27.5 \pm 2.5\%$. The antihemolytic activity showed a percentage of stabilization of the membrane of red blood cells with $59.64 \pm 4.23\%$ at a concentration of 1000 µg / ml. We conclude that locust bean gum is a good source of bioactive composed for human health and very high economic and therapeutic value.

Keys words: *Ceratonia siliqua* L, Galactomannane, Endosperme, Antihemolytic, Antioxydant, Anti-inflammatory.

ملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للالتهابات، مضاد التهاب كريات الدم الحمراء ومضاد الأكسدة لعدد السكريات في صمغ الخروب الذي تم الحصول عليه باستخدام تقنية الموجات فوق الصوتية بمساعدة المحلول. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقة *DPPH* ، وأظهرت النتائج انخفاض إمكانات مضادات الأكسدة مع نسبة تثبيط $7.625 \pm 1.761\%$ لتركيز 1 مجم / مل. كانت نسبة الذوبان 60% عند 25 درجة مئوية و 100% عند 80 درجة مئوية. أظهرت قدرة لتثبيت تجانس المحلول قدرت ب $27.5 \pm 2.5\%$. كما أظهر النشاط المضاد للتسمم نسبة استقرار لغشاء خلايا الدم الحمراء بنسبة $59.64 \pm 4.23\%$ بتركيز 1000 ميكروجرام / مل. نستنتج أن صمغ الخروب هو جزيء حيوي كنز لصحة الإنسان وله قيمة اقتصادية وعلاجية عالية جداً.

الكلمات المفتاحية: جالاكتومانان ، صمغ الخروب ، مضاد للالتهابات ، مضاد التهاب خلايا الدم الحمراء ، مضاد للأكسدة.