

Comparison of the chemical composition and the antioxidant activity of the leaves of Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) collected in three sites of Djebel Zaghoun (Tunisia)

Comparaison de la composition chimique et de l'Activité antioxydante des feuilles de Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) collectées dans trois sites de Djebel Zaghoun (Tunisie)



S. Dallali^{1,2*}, F. Aloui¹, H. Selmi¹, H. Sebei²

¹Sylvo-Pastoral Institute of Tabarka Laboratoire des Ressources Sylvopastorales, 8110Tabarka, Tunisia

²Ecole Supérieure d'Agriculture de Mograne, Département des Productions Agricoles, Laboratoire de Recherche « Systèmes de Production Agricole et Développement Durable » 1121, Zaghoun, Tunisie.

*Corresponding author: dallali_sana@yahoo.fr

Abstract - The carob tree leaves (*Ceratonia siliqua* L.) collected from National Park of Djebel Zaghoun in three different sites are analyzed for their fatty acid composition, phenolic compounds and antioxidant activity. Total lipids were extracted by an organic solvents mixture. The fatty acid composition was determined using gas chromatography (GC-FID). The total phenolic and total flavonoid contents of dry extract of leaves was evaluated using Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was tested by the DPPH free radical scavenging assay. Results showed that total fatty acid content varied from 45.22 to 21.33 mg/g dw. Twelve fatty acids were identified and linolenic acid is the predominant fatty acid (29.40–35.78%), followed by linoleic acid (14.02–15.88%), stearic acid (14.03–14.98%) and palmitic acid (5.24–13.87%). The oil contains from 54.68 to 62.52% unsaturated fatty acid. The contents of total phenols ranged from 2.50 to 6.45mg EGA/g dw. The amount of flavonoids varies from 3.42 to 7.42 mg EQ/g dw. Moreover, the evaluation of antioxidant methanolic extract showed a very important activity expressed (70.29–83.70%). These results indicated that the leaves of carob tree have different richness in unsaturated fatty acids following sites and the extracts tested have an antioxidant effect.

Keywords: *Ceratonia siliqua* L., Phenolic compounds, Flavonoids, Total lipids, Antioxidant activity, Tunisia.

Résumé- Les compositions en acides gras et en composés phénoliques ont été réalisées dans les feuilles du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) collectées dans trois sites de différents états de végétation du Parc National de Djebel Zaghoun. Les huiles fixes des feuilles extraites par des solvants organiques ont été analysées par GC-FID. Les teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux des extraits méthanoliques ont été déterminées par spectrophotométrie. La capacité antioxydante des extraits a été évaluée par le test DPPH. Les résultats obtenus ont montré que les lipides totaux (45,22±0,31, et 21,33±0,82 mg/g MS) varient en fonction du lieu de récolte. Douze acides gras ont été identifiés : l'acide linoléique est le principal acide gras (29,40-35,78%) suivi par les acides linoléique (14,02-15,88%), stéarique (14,03-14,98%) et palmitique (5,24-13,87%). Les proportions en acides gras insaturés sont de 54,68, et 62,52% dans les huiles. Les teneurs en phénols totaux (2,50±0,14 à 6,45±0,22 mg EAG/g MS), Les flavonoïdes (3,42±0,55 à 7,42±0,22 mg EQ/g MS) varient également en fonction des sites. Par ailleurs, l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique a montré une activité très importante allant jusqu'à 83,70%. L'acide ascorbique, pris comme référence, a montré une activité antioxydante puissante (82,97 à 87,60%). Ces résultats révèlent que les feuilles du caroubier présentent des richesses différentes en acides gras insaturés suivant les sites et que les extraits testés ont un effet antioxydant.

Mots clés : *Ceratonia siliqua* L., Phénols, Flavonoïde, Lipides totaux, Activité antioxydante, Tunisie.

1. Introduction

Les huiles végétales sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour la fabrication d'une grande variété de produits, allant des margarines de chocolat ou utilisées directement comme huiles pour salade et de cuisson (Trabelsi et al, 2012). La composition en acides gras des huiles provenant de sources végétales varie selon l'origine de la plante, les facteurs génétiques et les conditions climatiques (Cheikh-Rouhou et al, 2007 ; Trabelsi et al, 2012). La compréhension des changements dans les proportions d'acides gras des plantes dans des conditions spécifiques est importante pour la qualité de l'huile (Karaca et Aytac, 2007). Des études antérieures ont également montré que la synthèse d'acides gras peut varier en fonction de facteurs écologiques, morphologiques et physiologiques (Baydar, 2000). En plus de ces conditions affectant la composition en acides gras, des facteurs génotypiques jouent un rôle important dans le processus entraînant une composition différente en acides gras de chaque génotype.

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées (Bougandour et al., 2012). L'extraction de principes actifs à partir de matière végétale, notamment le cas des polyphénols végétaux, suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leur pouvoir antioxydant et antiradicalaire élevé (Bonnaillie et al., 2012 ; Mahmoudi et al., 2013). Plusieurs études ont souligné des activités biologiques très importantes des composés phénoliques liées à leurs propriétés antioxydantes et antiradicalaires (Ojeil et al., 2010 ; Meddour et al., 2013). En effet, les polyphénols constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans les végétaux dénombant plus de 8000 structures phénoliques connus, avec plus de 4000 flavonoïdes identifiés (Harborne et Williams, 2000; Lugasi et al., 2003 ; Cheynier, 2005). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits (Boizot et Charpentier., 2006). Les biométabolites jouent un rôle indéniable dans la protection des plantes vis à vis de différents stress (Fadel et al., 2011). Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires ; ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Gourine et al., 2010 ; Fadel et al., 2011). L'activité antioxydante joue un rôle dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (Tsao, 2010 ; Meddour et al., 2013).

Le caroubier (*C. siliqua* L.) est une espèce arborescente, spontanée ou cultivée, et de grande importance socio-économiques et écologiques (Batlle et Tous, 1997 ; Gharnit et al., 2001). Elle tolère bien la sécheresse d'où sa répartition dans les régions arides et semi-arides du climat méditerranéen (Gharnit et Ennabili, 2009). Le caroubier présente un réservoir potentiel de molécules naturelles bioactives (Hsouna et al., 2011). Il contient également des composés phénoliques qui lui confèrent différents rôles antioxydant, facilité de la digestion et baisse du taux cholestérol (Hajaji et al., 2011). Différentes études ont montré que ces polyphénols sont essentiellement des tanins condensés, des proanthocyanidines, des flavonoïdes, des ellagitannin (Avallone al., 1997; Owen al., 2003; Makris et Kefalas, 200). Les usages de cette espèce sont multiples en alimentation, en médecine, en industrie et en cosmétique (Gharnit et al., 2001). Les feuilles et les fruits sont utilisés pour soigner diverses maladies (Hsouna et al., 2011). L'écorce et les feuilles ont été utilisées dans la médecine populaire tunisienne comme laxatif, diurétique, anti-diarrhéique et pour le traitement de la gastro-entérite (Kivçak et al., 2002 and Hsouna et al., 2011). La gousse du caroubier, comestible et sucrée, présente une valeur énergétique importante. Elle est aussi employée en agroalimentaire comme antioxydant grâce à sa composition riche en polyphénols (Biner et al., 2007; Fadel et al., 2011; Gillet et al., 2014).

Ainsi, une caractérisation biochimique de cette espèce dans la région de Zaghouan occupant des sites différents serait d'une importance capitale pour une meilleure valorisation. Dans ce contexte, l'objectif du présent travail est d'analyser la composition chimique des acides gras et déterminer les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux et d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de feuilles de caroubier collectées dans trois sites différents aspects de dégradation à Djebel Zaghouan.

2. Matériel et méthodes

2.1. Sites et Matériel végétal

Les feuilles de *Ceratonia siliqua* sont collectées à Djebel Zaghouan (Nord-Est de la Tunisie) dans trois sites différents suivant un gradient de dégradation. Site 1 [latitude 36°22'34,590"(N); longitude 10°06'58,690" (E); altitude 850 m] : milieu conservé où les végétaux sont vigoureux produisant une

biomasse très importante. Site 2 [latitude 36°22'17,594" (N); longitude 10°06'30,589" (E); altitude 804 m] : milieu modérément dégradé où les végétaux montrent une vigueur moyenne. Site 3 [latitude 36°22'15,427" (N) ; longitude 10°06'33,185"(E) ; altitude 768m] : milieu dégradé où les plantes produisent des biomasses faibles et les arbres sont chétifs. La dégradation de ce site est causée par des facteurs écologiques (faibles précipitations, sécheresse, pente forte et richesse faible du sol) et anthropiques (surpâturage, incendies, déboisement). Les sites appartiennent à la zone bioclimatique subhumide avec une pluviométrie comprise entre 500 et 650 mm/an. Les feuilles ont été séchées à l'air libre dans les conditions ambiantes du laboratoire, ensuite réduites en fine poudre grâce à un broyeur mécanique de type Retsch.

2.2. Préparation des extraits méthanoliques, dosages des phénols totaux et des flavonoïdes totaux

Une quantité de 1g de poudre des feuilles a été macérée dans 20 ml du méthanol pendant 48h. Après filtration, le solvant est évaporé à sec à 45°C et sous pression réduite. Les résidus secs sont pesés et repris par 3 ml du méthanol et conservés à 4 °C jusqu'à utilisation (Benhammou et al., 2008).

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). La lecture est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway-6300 à 760nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par g de matière sèche (mg EAG/g MS).

La quantification des flavonoïdes dans les extraits, a été effectuée par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃), en suivant le protocole de Yi et al. (2007). L'absorbance est lue à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway-6300. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent quercétine par g de matière végétale sèche (mgEQ/g MS). Toutes les mesures ont été répétées trois fois.

2.3. Activité antiradicalaire

Pour évaluer in vitro les activités antiradicalaires des feuilles de *C. siliqua*, nous avons utilisé la méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl). La couleur violette foncée déterminée à 517nm, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire de l'extrait (Locatelli et al., 2010). L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole cité par Loo et al. (2008). La lecture a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway-6300 à 517nm. Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH est calculé d'après la formule suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} 100 \quad (1)$$

Où, A₁ est l'absorbance du contrôle négatif ; A₂ est l'absorbance de l'extrait/standard.

2.4. Extraction des lipides totaux, méthylation et analyse chromatographique des acides gras

L'extraction est faite manuellement selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). La teneur en lipides totaux exprimée en mg par g de matière sèche a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en lipides totaux (mg/g MS)} = \frac{m}{M} \quad (2)$$

Avec, **m** : masse de l'extrait (mg) et **M** : masse de matière sèche (g)

Les acides gras ont été convertis en leurs esters méthyliques selon la méthode décrite par Cecchi et al., (1985). Le résidu sec est repris pour méthylation avec ajout de 2 ml d'hexane, 0,5 ml de C19 :0 et 0,5 ml de méthoxyde de sodium. Le mélange est fortement agité puis laissé reposer. Après addition de l'eau, la phase hexanique renfermant les méthyles esters d'acides gras est délicatement récupérée puis analysée par chromatographie en phase gazeuse. La séparation des différents esters méthyliques d'acides gras est effectuée par chromatographie en phase gazeuse (Shimadzu GC-2010, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon).

2.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données ont été effectuées par le Logiciel SAS (Statistics Analysis System) version 9.1. (2003). Les résultats sont soumis à une analyse de la variance (ANOVA) et la comparaison des moyennes est faite par le test multirange de Duncan au seuil de probabilité de 5%. Les mesures sont répétées au moins trois fois et les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

3. Résultats et Discussion

3.1. Lipides totaux des feuilles

L'étude de la teneur en lipides totaux des feuilles de *C. siliqua* a permis de déceler une variation significative ($P < 0,05$) de celle-ci en fonction des Sites (**Tableau 1**). Les résultats montrent que la plus faible teneur en lipides totaux ($21,33 \pm 0,82$ mg/g MS) est observée dans le Site 3 (état dégradé de la végétation). Par contre, la teneur maximale ($45,22 \pm 0,31$ mg/g MS) est observée dans le Site1 (état conservé). Ces variations de la teneur totale en lipides pourraient être dues à l'effet des facteurs génétiques, des conditions environnementales et édaphiques (Uzun et al., 2002; Ravi et al., 2007).

Tableau 1. Teneurs en lipides totaux des feuilles de *C. siliqua* en fonction des sites de collecte

Sites	Lipides totaux (mg/g MS)
Site1	$45,22 \pm 0,31^a$
Site2	$39,50 \pm 0,58^b$
Site3	$21,33 \pm 0,82^c$

Les valeurs de la même colonne avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (n = 3).

3.2. Composition en acides gras des feuilles de *Ceratonia siliqua*

Les analyses qualitative et quantitative des esters méthyliques d'acides gras des feuilles de Caroubier ont permis l'identification de 12 acides gras usuels (**Tableau 2**). Bien que les résultats des trois sites montrent une composition qualitative similaire, d'énormes différences quantitatives ont pu être observées. En effet, dans tous les sites étudiés, l'acide linoléique reste le principal acide gras ($29,40-35,78\%$), suivi par les acides linoléique ($14,02-15,88\%$), stéarique ($14,03-14,98\%$) et palmitique ($5,24-13,87\%$). Le profil en acides gras des feuilles de *C. siliqua* est à dominance d'acides gras insaturés. Cette fraction est dominée par l'acide linoléique (C18 :3n3) et l'acide linoléique (c9, 12-C18 :2). Toutefois, la contribution de ces acides gras dans la totalité de l'huile diffère d'un site à l'autre. Ainsi, les proportions maximales ($35,78\%$) en acide linoléique sont observées au niveau des feuilles collectées dans le site1. Les feuilles collectées dans le Site3 semblent accumuler les proportions les plus faibles ($29,40\%$) (**Tableau 2**). Sur le plan qualité des huiles évaluée par rapport AG insaturé/AG saturé, tous les échantillons de trois sites offerts des huiles de bonne qualité nutritionnelle en raison des proportions appréciables en acides linoléique et linoléique. La présence de l'acide linoléique dans les lipides foliaires de *C. siliqua* confirme le rôle structural de cet acide gras en tant que constituant essentiel des membranes chloroplastiques (Hugly et Somerville, 1992). Parallèlement, l'augmentation des proportions de l'acide linoléique est associée une réduction de celles de l'acide linoléique ce qui justifie les liens métaboliques existants entre les acides. Une telle tendance serait la conséquence d'une modulation de l'activité des enzymes désaturases. Ainsi, les résultats représentés dans le Tableau 2, montrent que dans tous les trois sites, les acides gras insaturés présentent les plus fortes proportions ($62,52$ à $54,68\%$), tandis que les acides gras saturés représentent les plus faibles proportions ($45,32$ à $37,48\%$). En effet, les acides gras saturés et insaturés sont influencés par des conditions environnementales telles que la température, les précipitations, et les géotypes (Sadeghi et Talaii, 2000 ; Schulte et al., 2013). La température influe sur le profil lipidique, à différents degrés. Des études antérieures ont montré que les profils lipidiques des quatre cultures étudiées sont affectés par la température et la quantité d'acide oléique augmente alors que la quantité d'acide linoléique et linoléique diminue avec l'augmentation de la température (Lajara et al., 1990 ; Zubr and Mattha, 2002). Les différences observées entre les sites pour la composition d'acide gras peuvent être également expliquées par les différentes altitudes des sites (Beyhan et al., 2011, Mahdavi et al., 2013). D'autres facteurs peuvent contribuer à la variation de la composition des acides gras dans la plante. Ainsi, plusieurs auteurs ont observé que la teneur en acides gras a été fortement influencé par l'âge de la plante, les divers facteurs physiologiques, géographiques et écologiques (Uzun et al., 2002; Msaâda et al, 2009; Tulukcu, 2011; Trabelsi et al, 2012). Les conditions écologiques, la variété, les techniques et les pratiques culturelles influent sur la qualité et la composition en acides gras de la noisette (Beyhan et al.,

2011). En outre, Parcerisa et al. (1993) ont indiqué que la composition de l'huile de noixette est influencée par la provenance géographique. Des conditions abiotiques tels que la disponibilité en eau peuvent également affecter la composition des acides gras de la plante (Laribi et al., 2011). Cependant, il n'existe aucune étude détaillée sur la composition des acides gras à caractère déterminisme (Tulukcu, 2011).

Tableau 2. Composition en acides gras (%) des feuilles de *C. siliqua* en fonction des sites de collecte.

Acide gras	Site1	Site2	Site3
Acide myristique (C14:0)	4,24±0,23 ^c	3,30±0,28 ^b	5,03±0,12 ^a
Acide palmitique (C16:0)	5,24±0,63 ^c	12,68±0,11 ^b	13,87±0,21 ^a
Acide palmitoléique (C16:1)	2,07±0,12 ^b	4,02±0,07 ^a	3,63±0,09 ^a
Acide margarique (C17:0)	5,07±0,07 ^a	5,04±0,27 ^a	2,37±0,17 ^b
Acide stéarique (C18:0)	14,03±0,03 ^c	13,10±0,22 ^b	14,98±0,14 ^a
Acide oléique (c9, C18:1)	6,49±0,10 ^a	6,56±0,16 ^a	3,30±0,11 ^b
Acide linoléique (c9, 12-C18:2)	15,88±0,14 ^b	15,30±0,23 ^c	14,02±0,25 ^a
Acide γ -Linolenique (C18:3n6)	1,62±0,03 ^a	1,17±0,05 ^b	1,23±0,11 ^b
Acide linolenique acid (C18:3n3)	35,78±0,75 ^a	30,26±0,26 ^b	29,40±0,26 ^c
Acide eicosénoïque (c11, C20:1)	0,62±0,02 ^a	0,57±0,04 ^a	3,10±0,10 ^b
Acide béhénique (C22:0)	6,14±0,03 ^a	5,78±0,12 ^b	6,45±0,15 ^a
Acide lignocérique (C24:0)	2,83±0,05 ^a	2,22±0,02 ^b	2,62±0,07 ^a
Acides gras Saturés (%)	37,48 ^c	42,12 ^b	45,32 ^a
Acides gras Insaturés (%)	62,52 ^a	57,88 ^b	54,68 ^c
AG insaturé/AG saturé	1,67	1,37	1,21

Les valeurs de la même colonne avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (n = 3).

3.3. Teneurs en phénols totaux

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Les teneurs en phénols totaux des extraits méthanolique de *C. siliqua* sont présentées dans le **Tableau 3**. Les teneurs en phénols totaux varient de 2,50±0,14 à 6,45±0,22 mg EAG/g MS. Les résultats montrent que toutes les feuilles étudiées sont riches en polyphénols. En effet, les extraits du Site 3 présentent les teneurs les plus élevées (6,45±0,22 mg EAG/g MS) suivi par ceux du Site 2 (4,38±0,17 mg EAG/g MS). Les extraits du Site 1 présentent les teneurs en phénols totaux les plus faibles (2,50±0,14 mg EAG/g MS). La variation de la teneur en phénols totaux en fonction du site de collecte de la plante est hautement significative ($p < 0,01$). Nos résultats montrent que la teneur en phénols totaux varie d'un site à un autre pour la même plante. En effet, les variations observées seront probablement dues à de nombreux facteurs notamment les facteurs climatiques et environnementaux (température, altitude, ensoleillement et précipitation), la zone géographique, la sécheresse et les maladies (Ebrahimi et al., 2008; Andarwulan et al., 2010), la période de collecte des échantillons et le stade de développement de la plante (Miliauskas et al., 2004). En fait, une augmentation de la biosynthèse et l'accumulation des composés phénoliques se produit fréquemment dans les tissus végétaux en réaction aux stress biotiques et abiotiques. Ces composés participent à la défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont inévitablement produites lorsque le métabolisme aérobie ou photosynthétique est affaibli par des stress environnementaux. Les facteurs génétiques et les conditions de croissance de la plante peuvent jouer un rôle important dans la formation de métabolites secondaires, y compris les acides phénoliques (Islam et al., 2003; Hashempour, et al, 2010). D'autres facteurs d'ordre techniques en particulier la méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (Lee et al., 2003).

Tableau 3. Teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux des feuilles de *C. siliqua* en fonction des sites de collecte.

Sites	Phénol totaux (mg EAG/g MS)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g MS)
Site1	2,50±0,14 ^c	3,42±0,55 ^c
Site2	4,38±0,17 ^b	6,75±0,38 ^b
Site3	6,45±0,22 ^a	7,42±0,22 ^a

Les valeurs de la même colonne avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (n = 3).

3.4. Teneurs en flavonoïdes

Le tableau 3 donne des teneurs en flavonoïdes totaux variable d'un site de collecte à un autre. Les feuilles du Site 3 enregistre la plus forte teneur (7,42±0,22 mg EQ/g MS), suivies des teneurs des feuilles du Site 2 (6,75±0,38 mg EQ/g MS). Les feuilles du Site 1 sont les moins riches en flavonoïdes totaux (3,42±0,55 mg EQ/g MS). Statistiquement la différence entre les teneurs en flavonoïdes en fonction du site de collecte de la plante est hautement significative. Il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat (site 3). En effet, à une telle situation la plante doit mettre en place un mécanisme de défense adéquat capable de lui assurer le maintien des ses activités physiologiques et biochimiques. La production excessive des phénols, l'activation des enzymes antioxydantes en particulier les peroxydase (POD), les superoxydes dismutase (SOD) et les catalases (CAT) sont parmi ces mécanismes de défense (Morina et al., 2010). La différence dans le contenu phénolique (y compris les flavonoïdes) décrit dans la littérature peut être attribuée à plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction et la méthode de quantification. Par ailleurs, les facteurs climatiques et environnementaux (la zone géographique et la sécheresse), la période de la récolte et le stade de développement de la plante peuvent également influencer l'estimation de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes (Locatelli et al., 2010).

3.5. Activité antioxydante (Test de DPPH)

Les résultats du tableau 4 révèlent que tous les extraits testés ainsi que l'acide ascorbique pris comme référence ont un effet antioxydant. L'extrait méthanolique du Site 3 a présenté l'activité antioxydante la plus élevée (83,70%) par rapport à l'extrait du Site 2 (81,26%) et du Site 1 (70,29%). L'acide ascorbique a montré une activité antioxydante puissante (82,97 à 87,60%). L'activité anti radicalaire est peut-être liée à la présence des polyphénols et des flavonoïdes dans ces extraits (Ismail et al., 2010). En effet, Fadel et al.(2011) ont rapporté que les feuilles et l'écorce de *C. siliqua* sont riches en composés phénoliques. Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Kouri et al., 2007). Ce dernier réagit avec le radical DPPH en réduisant un nombre égal aux groupements hydroxyles portés par la molécule de l'antioxydant (Bondet et al., 1997). Cependant, d'autres études ont montré que l'activité antiradicalaire est corrélée avec le taux des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits des plantes (Mariod et al., 2009 ; Locatelli et al., 2010). L'effet antioxydant des différents extraits du caroubier pourrait être dû à un synergisme entre les polyphénols et d'autres composants.

Selon Hsu et al. (2007), les composés phénoliques sont largement distribués dans les tissus des plantes parmi lesquels se retrouvent de nombreuses molécules antiradicalaires et antioxydantes. Par ailleurs, Hatano et al. (1989), Duh et al. (1999) et N'guessan et al. (2007) ont montré l'existence d'une corrélation entre les teneurs en phénols totaux et l'activité antiradicalaire. Les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur structure chimique idéale (Turkmen et al., 2007). Les phénols sont des constituants des plantes très importants en raison de leur capacité de piégeage des radicaux libres. Par conséquent, la teneur en composés phénoliques des plantes peut contribuer directement à leur action antioxydante et il est probable que l'activité des extraits est due à ces composés (Tosun et al., 2009; Ghasemzadeh et al., 2010). La forte activité antioxydante de *C. siliqua* serait donc liée à leur forte teneur en phénols totaux. Nos résultats sont en accord avec les travaux

d'Adedapo et al. (2008). Selon ces auteurs, les plantes qui possèdent une bonne activité antioxydante contiennent de fortes teneurs en groupement phénoliques. Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques devrait être prise en considération dans l'activité biologique (Bourgou et al., 2008).

Tableau 4. Activité antioxydante (%) des feuilles *C. siliqua* en fonction des sites de collecte

Sites	Extrait méthanolique	Acide ascorbique
Site1	70,29±0,56 ^c	82,97±0,20 ^c
Site2	81,26±0,11 ^b	85,37±0,29 ^b
Site3	83,70±0,10 ^a	87,60±0,16 ^a

Les valeurs de la même colonne avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (n = 3)

4. Conclusion

La composition en acides gras des feuilles *C. siliqua* est dominée par les acides gras insaturés dans les trois sites. Le pourcentage des différents composés diffère d'un site de collecte à un autre. Les feuilles de caroubier contiennent des teneurs importantes en polyphénols. Le test au DPPH a révélé que les extraits des feuilles présentent une activité antiradicalaire très importante ; toutefois, l'activité de l'extrait méthanolique du Site 3 est plus élevée que celle des autres sites. Toutefois, les substances non-phénoliques peuvent être responsables de l'activité antioxydante de *C. siliqua*. Par conséquent, d'autres études sont nécessaires pour identifier les composés phénoliques responsables de l'activité antioxydante de l'espèce, et évaluer la façon dont les substances phénoliques contribuent à cette activité.

5. Références

- Adedapo A. A., Sofidiya M.O., Maphosa, V., Moyo, B., Masika, P.J. and Afolayan, A. J., 2008.** Anti-inflammatory and Analgesic activities of the aqueous extract of *Cussonia paniculata* stem bark. *Rec. Nat. Prod.*, 2(2), 46-53.
- Andarwulan N., Batari, R., Sandrosari, D. A., Bolling, B. and Wijaya, H., 2010.** Flavonoid content and antioxidant activity of vegetable from Indonesian. *Food chemistry*, 121, 1231-1235.
- Avallone R., Plessi, M., Baraldi, M., et Monzani, A., 1997.** Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10,166–172.
- Battle I. and Tous, J., 1997.** Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. *Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research*, 17, 1-92.
- Baydar H., 2000.** Lipid synthesis in plants, quality and the importance of improvement methods for increasing of quality. *J. Ekin.*, 11, 50–57.
- Benhammou N., Atik Bekkara, F., Kadifkova Panovsk, T., 2009.** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*, 12, 1259–1266.
- Beyhan Ö., Aktaş, M., Yilmaz, N., Şimşek, N., Gerçekçiöğlü, R., 2011.** Determination of fatty acid compositions of some important almond (*Prunus amygdalus* L.) varieties selected from Tokat province and Eagean region of Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research.*, 5(19), 4907-4911.
- Biner B., Gubbuk, H., Karhan, M., Aksu, M. et Pekmezci, M., 2007.** Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, 100, 1453-1455.
- Bligh E.G., Dyer, W.J., 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911–917.
- Boizot N. et Charpentier J.P., 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le cahier des Techniques de l'Inra. pp79-82.
- Bondet V., Williams, W.B., Berset, C., 1997.** Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 30, 609-615.

- Bonnaillie C., Salacs, M., Vassilova, E., Saykova, I., 2012.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, 7, 35-45.
- Bourgou S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B., 2008.** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies*, 331, 48–55.
- Duh P., 1999.** Antioxidant activity of water extract of four Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) varieties in soybean oil emulsion. *Food Chemistry*, 66(4), 471-476.
- Cecchi G., Biasini, S., Castano, J., 1985.** Methanolise rapide des huiles en solvant, *Note de laboratoire. Rev. Fr. Corps Gras*, 4, 163–164.
- Cheikh-Rouhou S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H., 2007.** *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chem.*, 101, 673-681.
- Cheyrier V., 2005.** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 223S-229S.
- Ebrahimi N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A. et Yousefzadi, M., 2008.** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages. *Food chemistry*, 110, 927-931.
- Fadel F., Fattouch, S., Tahrouch, S., Lahmar, R., Benddou, A., Hatimi, A., 2011.** The phenolic compounds of *Ceratonia siliqua* pulps and seeds. *J. Mater. Environ. Sci.*, 2(3), 285-292.
- Gharnit N., Ennabili, A., 2009.** Essais préliminaires de culture *in vitro* du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) originaire du nord-ouest du Maroc. *Biomatec Echo*, 3(6), 18 – 25.
- Gharnit N., Et Mtili, N., Ennabili, A.T. and Ennabili, A., 2001.** Social characterization and exploitation of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) from Mokrisset and Bab Taza (NW of Morocco). *Sci. Lett.*, 3 n°2.
- Ghasemzadeh A., Jaafar Hawa, Z. E., Rahmat, A., 2010.** Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids Content in Two Varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 15, 4324-4333.
- Gillet S., Blecker, C., Paquot, M., Richel, A., 2014.** Relationship between chemical structure and physical properties in carob galactomannans. *C. R. Chimie*, 17, 386–401.
- Gourine N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P., Gaydou, E., 2010.** Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 31, 203-208.
- Hajaji H.E., Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., Bali, B.E., Lachkar, M., 2011.** Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 4, 321–324.
- Harborne J.B., Williams, C.A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55:481-504.
- Hashempour A., Ghazvini, RF., Bakhshi, D., Sanam, S.A., 2010.** Fatty acids composition and pigments changing of virgin olive oil (*Olea europea* L.) in five cultivars grown in Iran. *Aust J Crop Sci.*, 4(4), 258-263.
- Hatano T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. & Okuda T., 1989.** Effect of interaction of tannins with co-existing substances VI. Effect of tannins and related polyphenols on superoxyde anion radical and on DPPH radical. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 2016-2021.
- Hsouna A.B., Saoudi, M., Trigui, M., Jamoussi, K., Boudawara, T., Jaoua, S., Feki, A.E., 2011.** Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of *Ceratonia siliqua* leaf extract against CCl₄ induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 49, 3183-3191.
- Hsu C.Y., Chan, Y.P., Chang, J., 2007.** Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biol Res.*, 40, 13-21.
- Hugly S., and Somerville, C., 1992.** A Role for Membrane Lipid Polyunsaturation in Chloroplast Biogenesis at Low Temperature. *Plant Physiol.*, 99,197-202.

- Islam MS., Yoshimot, o M., Ishigure, K., Okuno, S., Yamakawa, O., 2003.** Effect of artificial shading and temperature on radical scavenging activity and polyphenolic composition in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *J Amer Soc Hort Sci.*, 128, 182-187.
- Ismail H.I., Chan, K.W., Mariod, A.A., Ismail, M., 2010.** Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry*, 119, 643-647.
- Karaca E., Aytac, S., 2007.** The factors affecting on fatty acid composition of oil crops, Ondokuz Mayıs University, *Journal of Agricultural Science*, 22, 123-131.
- Kivçak B., Mert, T., 2002.** Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia*, 73, 242-243.
- Kouri G., Tsimogiannis D., Haido Bardouki H., Oreopoulou V., 2007.** Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative of Food Science and Emerging Technolgy*, 8, 155-168.
- Lajara J.R., Diaz, U., Quidello, R.D., 1990.** Definite influence of location and climatic conditions on the fatty acid composition of sunflower seed oil. *J. Am.Oil Chem.*, 67(10), 618-623.
- Laribi B., Kouki, K., Mougou, A., Marzouk, B., 2011.** Essential oil and fatty acid composition of a Tunisian Caraway (*Carum Carvi* L.) seed ecotype cultivated under water deficit. *Advances in Environmental Biology*, 5(2), 257-264.
- Lee K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J. et Lee, C.Y., 2003.** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51, 7292-7295.
- Locatelli M., Travaglia, F., Coisson, J.D., Martelli, A., Stevigny, C., Arlorio, M., 2010.** Total antioxidant activity of hazelnut skin (*Nocciola Piemonte* PGI): Impact of different roasting conditions. *Food Chemistry*, 119, 1647-1655.
- Loo A.Y., Jain, K., Darah, I., 2008.** Antioxydant activity of compound isolated from the pyrolygneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food chemitry*, 107, 1151-1160.
- Maataoui B.S., Hmyene, A., Hilali, S., 2006.** Activités antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1), 3-8.
- Mahdavi M., Jouri, M.H, Mahmoudi, J., Rezazadeh, F., Mahzooni-Kachapi, S.S., 2013.** Investigating the altitude effect on the quantity and quality of the essential oil in *Tanacetum polycephalum* Sch.-Bip. *polycephalum* in the Baladeh region of Nour, Iran. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(5), 0553-0559.
- Mahmoudi S., Khali, M., Mahmoudi, N., 2013.** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie*, 9, 35-40.
- Makris D.P. et Kefalas, P., 2004.** Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a Source of Polyphenolic Antioxidants. *Food Technol. Biotechnol.*, 42(2) ,105-108.
- Mariod A.A., Ibrahim, R.M., Ismail, M., Ismail, N., 2009.** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 116, 306-312.
- Meddour A.,Yahia, M., Benkiki, N., Ayachi, A., 2013.** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa* L. *Lebanese Science Journal*, 14(1) :49-60.
- Miliauskas G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A., 2004.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*, 85, 231-23.
- Morina F., Jovanovic, L, Mojovic, M., Vidovic, M., Pankovic, D., Veljovic Jovanovic, S., 2010.** Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* is caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall. *Physiol Plant*, 140(3), 209-24.
- Msaâda K., Hosni, K., BenTaarit, M., Hammami, M., Marzouk, B., 2009.** Effects of growing region and maturity stages on oil yield and fatty acid composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 120, 525-531.
- N'guessan, J.D., Zirihi, G.N., Kra, A.K.M., Kouakou K., Djaman, A.J., Guede-Guina, F., 2007.** Free radical scavenging activity, flavonoid and phenolic contents of selected Ivoirian plants. *IJONAS*, 4,425-429.
- Ojeil A., Darra, N.E., Hajj, Y.E., Mouncef, P.B., Rizk, T.J., Maroun, R.G., 2010.** Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin château ksara. *Lebanese Science Journal*, 11(2), 117-131.

- Owen R.W., Haubner, R., Hull, W.E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartscha, H., 2003.** Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, 4, 1727–1738.
- Parcerisa J., Rafecas, M., Castellote, A.I., Condony, R., Frran, A., Garcia, J., Gonzalez, C., Lopez, A., Romero, A., Boatella, J., 1995.** Influence of Variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Coryllus avellana* L.) from Spain: (III) oil stability, tocopherol content and some mineral contents (Mn, Fe, Cu). *Food Chem.*, 1(53):71 – 74.
- Ravi R., Prakash, M., Bhat, K.K., 2007.** Aroma Characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) oil samples. *European Food Research and Technology*, 225, 367-374.
- Sadeghi H. and Talaii, A.R., 2000.** Impact of environmental conditions fatty acids combination of olive in an Iranian olive cv Zard. *ISHS Acta Horticulturae 586: IV International Symposium on Olive Growing*, p. 586.
- Schulte L.R., Ballard, T., Samarakoon, Yaoc, L., Vadlani, P., Staggenborg, S., Rezac, M., 2013.** Increased growing temperature reduces content of polyunsaturated fatty acids in four oilseed crops. *Industrial Crops and Products*, 51, 212–219.
- Singleton V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Trabelsi H., Cherif O.A., Sakouhi F., Villeneuve P., Renaud J., Barouh N., Boukhchina S., Mayer P., 2012.** Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chemistry*, 131, 434–440.
- Tosun M., Ercisli, S., Sengul, M., Ozer, H., Polat, T., 2009.** Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biol. Res.*, 41, 175-181.
- Tsao R., 2010.** Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- Tulukcu E., 2011.** A comparative study on fatty acid composition of black cumin obtained from different regions of Turkey, Iran and Syria. *African Journal of Agricultural Research*, 6, 892-895.
- Turkmen N., Velioglu, Y. S., Sari, F., Polat, G., 2007.** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12, 484-496.
- Uzun B., Ulger, S., Cagirgan. I.M., 2002.** Comparison of determinate and indeterminate types of sesame for oil content and fatty acid composition. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 26, 269-274.
- Yi Z.-B., Yu, Y., Liang, Y.-Z., Zeng, B., 2007.** In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids, *LWT-Food Science and Technology*. 4, 1000-1016.
- Zubr J., Mattha, B., 2002.** Effects of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina sativa* oil. *Ind. Crop. Prod.*, 15, 155–162.