

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Spécialité Biochimie Appliqué



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude comparative entre les teneurs en composés phénoliques
des extraits des feuilles du caroubier de Bejaia et Jijel**

Présenté par :

Hammouche katia & Idiri manel

Soutenu le : 18 Juin 2023

Devant le jury composé de :

Mr OTMANIA	MCB	Président
Mme FARHI-BOUADAM B	MCB	Encadreur
Mr TACHERFIOUT M	MCA	Examineur

Année universitaire : 2022 / 2023

Dédicace

Je dédie ce travail :

A ma chère mère «Fadila» qui m'a toujours offert son amour et son affection

A mon père «Mohand Amoukrane» qui a fait beaucoup de sacrifices pour moi

A mes sœurs «Liticia, Maya» et mon frère «Ali»

A ma cousine «Soraya » et mes nièces «Lydia et Lamia» pour leur soutien

A mes grands pères

A Manel et à toute sa famille

A toute la promotion Biochimie appliquée

A mon Encadreur Dr FARHI Epouse BOUADAM .

A Toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce
travail ;

Je leur dis « merci ».

KATIA

Dédicace

Je dédie ce travail

À mes chers parents qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite. J'espère qu'un jour je pourrai

Leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu leur prête bonheur et longue vie.

A mes chers frères : Mahdi et Adlane

A ma chère sœurs : Ryma

A mes adorables grand-mères : Yasmina et Rekia que dieu leur accorde une longue vie

A Katia et toute la famille Hammouche

A tous mes amis : Sarah, Anaïs, Ahlam, Cecylia.....

A toute la promotion Biochimie appliquée

A mon Encadreur Dr FARHI Épouse BOUADAM.

MANEL

Remerciements

*Avant et après tout, nous remercions le bon Dieu le tout puissant de nous
avoir
donné du courage, la patience et de la santé pour bien continuer et réaliser ce
modeste
travail.*

*Nous tenons à remercier notre Encadreur Mme BOUADAM-FARHI B. de
nous avoir encadrés, orientés, aidés et conseillés.*

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury:

Mr TACHERFIOUT M. et OTMANI A.

*pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail en acceptant de présider et
d'examiner notre travail.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous les enseignants de
département BPC, plus particulièrement la spécialité
Biochimie Appliqué.*

Katia et Manel.

Sommaire

INTRODUCTION	01
<u>PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
Chapitre I : Présentation du caroubier.....	03
Chapitre II : Métabolisme secondaire.....	08
Chapitre III : Métabolites secondaires du caroubier.....	10
<u>DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION IN VITRO</u>	
I. Matériel végétal	11
I.1. Echantillonnage.....	11
II. Méthodes	12
II.1. Extraction des polyphénols.....	12
II.1.1. Dosage des polyphénols totaux.....	13
II.1.2. Dosage des flavonoïdes.....	13
II.1.3. Dosage des tanins.....	13
II.1.3.1. Dosage des tanins hydrolysables.....	13
II.1.3.2. Dosage des tanins condensés.....	14
II.1.3.3. Dosage des proanthocyanidines.....	14
II.2. Evaluation de l'activité anti-oxydante <i>in vitro</i>	15
II.2.1. Test de réduction du fer	15
II.2.2. Test de Piégeage du radical libre DPPH.....	15
II.2.3. Test de piégeage du radical libre ABTS.....	16
II.2.4. La chélation du fer	17

III. Analyse statistique.....	17
--------------------------------------	-----------

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISSCUSION

I. Résultats du dosage des composés phénoliques.....	18
-------------------------------------------------------------	-----------

I.1. Résultats du dosage des polyphénols totaux.....	18
------------------------------------------------------	----

I.2. Résultats du dosage des flavonoïdes.....	20
-----------------------------------------------	----

I.3. Résultats du dosage des tanins hydrolysables.....	22
--------------------------------------------------------	----

I.4. Résultats du dosage des tanins condensés.....	24
----------------------------------------------------	----

I.5. Résultats du dosage des proanthocyanidines.....	26
------------------------------------------------------	----

II. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante.....	28
----------------------------------------------------------------------	-----------

II. 1. Résultats du pouvoir réducteur.....	28
--------------------------------------------	----

II.2. Résultats de piégeage du radical DPPH.....	30
--------------------------------------------------	----

II.3. Résultats de piégeage du radical d'ABTS.....	32
----------------------------------------------------	----

II.4. Résultats de la chélation de Fer.....	34
---------------------------------------------	----

II.5. Résultats du test de corrélation de Pearson.....	36
--------------------------------------------------------	----

CONCLUSION.....	38
------------------------	-----------

REFERNECES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUME / ABSTRACT

Liste des tableaux

Tableau I.	Composition en minéraux	08
Tableau II.	Altitude des stations d'étude	12
Tableau III.	Résultats de test de signification de Tukey des polyphénols totaux	
Tableau IV.	Résultats de test de signification de Tukey des flavonoïdes	
Tableau V.	Résultats de test de signification de Tukey des tanins hydrolysables	
Tableau VI.	Résultats de test de signification de Tukey des tanins condensés	
Tableau VII.	Résultats de test de signification de Tukey des proanthocyanidines	
Tableau VIII.	Résultats de test de signification de Tukey du pouvoir réducteur	
Tableau IX.	Résultats de test de signification de Tukey du DPPH	
Tableau X.	Résultats de test de signification de Tukey d'ABTS	
Tableau XI.	Résultats de test de signification de Tukey de chélateur de fer	
Tableau XII.	Résultats de test de corrélation de Pearson	44

Liste des figures

Figure n° 01.	Appareils végétatif et reproducteur de caroubier	05
Figure n° 02.	Distribution du caroubier dans le monde	06
Figure n° 03.	Structure nucléaire des flavonoïdes	09
Figure n° 04.	Structure des tanins hydrolysables	10
Figure n° 05.	Principales formes des tanins condensés	11
Figure n° 06.	Image satellitaire de la station d'étude	12
Figure n° 07.	Un échantillon des feuilles avant et après séchage	13
Figure n° 08.	Teneurs des polyphénols totaux dans les extraits des différentes échantillons de <i>Ceratonia siliqua</i> L. provenant de deux régions	25
Figure n° 09.	Teneurs des flavonoïdes dans les extraits des différentes échantillons de <i>Ceratonia siliqua</i> L. provenant de deux régions	27
Figure n° 10.	Teneurs des tanins hydrolysables dans les extraits des différentes échantillons de <i>Ceratonia siliqua</i> L. provenant de deux régions	29
Figure n° 11.	Teneurs des tanins condensés dans les extraits des différentes échantillons de <i>Ceratonia siliqua</i> L. provenant de deux régions	31
Figure n° 12.	Teneurs des proanthocyanidines dans les extraits des différentes échantillons de <i>Ceratonia siliqua</i> provenant de deux régions	33
Figure n° 13.	Capacité du pouvoir réducteur dans les extraits des différents échantillons de <i>Ceratonia siliqua</i> L. provenant de deux régions	35
Figure n° 14.	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans les extraits des différents échantillons de <i>Ceratonia siliqua</i> L. provenant de deux regions	37
Figure n° 15.	Pourcentage d'inhibition du radical libre d'ABTS dans les extraits des différents échantillons de <i>Ceratonia siliqua</i> provenant de deux régions	39
Figure n° 16.	Le pourcentage de chélation de fer dans les extraits des différents échantillons de <i>Ceratonia siliqua</i> L. provenant de deux régions	41

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degrés celsius

AA : Activité antioxydante

ABTS : Sel d'ammonium de l'acide 2,2-azinobis-(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

BHA : Hydroxy-anisole butylé

Chel Fer : Chélateur de fer

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAT/gms : Equivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche

EC/gms : Equivalent de catéchine par gramme de matière sèche

EDTA : L'acide éthylène diamine tétra-acétique

EQ/gms : Equivalent de quercétine

F1 : Feuille de station 1 de Bejaia

F2 : Feuille de station 2 de Bejaia

F3 : Feuille de station 3 de Bejaia

f1 : Feuille de station 1 de Jijel

f2 : Feuille de station 2 de Jijel

f3 : Feuille de station 3 de Jijel

Fe²⁺ : Ion ferreux

Fe³⁺ : Ion ferrique

FeCl₂ : Chlorure de fer

FeCl₃ : Chlorure ferrique

FLAV : Flavonoïde

FeNH₄(SO₄)₂ : Sulfate d'ammonium ferrique

FRAP : Ferric reducing-antioxidant power

g : Gramme

HCl : Chlorure hydrogène

H₂O: Monoxyde de dihydrogène

Kg : Kilogramme

K₃FeCN₆ : Ferricyanure de potassium

M: Molaire

min: Minute

ml: Millilitre

mM: Millimolaire

N: Normalité

Na₂CO₃: Carbonate de sodium

nm: Nanomètre

PPT: Polyphénol totaux

PR: Pouvoir réducteur

TC: Tanin condensé

TCA: Acide trichloracétique

TH: Tanin hydrolysable

µg : microgramme

µm : micromètre

Introduction

Les estimations mondiales sur la médecine traditionnelle indiquent que plus de 13000 espèces de plantes qualifiées médicinales sont utilisées, partout dans le monde, comme remèdes traditionnels pour différentes maladies (Tyler, 1993). En effet, elles restent pour toujours la première source des principes actifs qui sont utilisés dans la fabrication des médicaments (Baghiani et al, 2012). Ces principes actifs sont extraits à partir des métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques, qui sont des composés synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux mécanisme de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (Visioli et al., 2000), leur concentration au sein de la plante varie d'un organe à un autre (Paris et Moyse, 1965).

Parmi les plantes qui sont connues pour leur richesse en composées phénoliques nous citons les plantes de la famille des Fabaceae ou légumineuse (Miller, 2000; Harriri et al., 2009; Singh et al., 2017). De cette famille, le caroubier, (*Ceratonia siliqua* L.) qui se caractérise par son importance écologique, économique et également par ses propriétés médicinales et thérapeutiques (Ghanemi et Belarbi, 2021).

En Algérie, pas mal d'études ont été effectuée sur la composition phénolique de *Ceratonia siliqua* L. , nous citons principalement celles réalisées durant la dernière décennie d'abord, le travail de Benkhaldi (2013) sur la détermination de l'activité antioxydante des polyphénols du caroubier de Tlemcen, puis celui de Benyahia (2014) qui a mis en évidence l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques de la pulpe de la caroube par interaction prebiotique-pathogènes et celui de Mebirouk-Boudechichen et al. (2014) sur les teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles des échantillons issus de la région humide d'Algérie.

Au niveau local, nous citons l'étude de Meziani et al., 2015 qui ont testé le pouvoir antimicrobien des gousses du caroubier de Bejaia. Également les travaux de Mekhoukhe et al. (2016) sur l'étude de l'activité antioxydante des feuilles *Ceratonia siliqua* de Bejaia, ainsi que ceux d'Amessis-Ouchemoukh et al. (2017) sur les métabolites bioactifs impliqués dans

les activités antioxydantes, anticancéreuses et antalgiques de *Ceratonia siliqua* L. de Bejaia.

Néanmoins, nous avons constaté, d'après la recherche bibliographique que nous avons effectué, l'absence de données, notamment de point de vue phytochimique, sur le caroubier de Jijel, aussi les études qui ont été faites sur la région de Bejaia n'ont pas inclus des comparaisons de plusieurs stations. Alors notre travail vient pour compléter la bibliographie de l'espèce, tout en apportant une première contribution pour la composition phénolique du caroubier de la côte de Jijel puis de rechercher des éventuelles différences entre des échantillons issus de différentes stations de Bejaia.

L'objectif du présent travail est de comparer, la composition phénolique et l'activité antioxydante, d'abord entre les échantillons (feuilles) de la même région puis entre les échantillons provenant des deux régions (Bejaia et Jijel). Aussi, de mettre en évidence, statistiquement, les éventuelles différences qui pourraient être constatées.

La présente introduction sera suivie par :

- Une synthèse bibliographique qui synthétisera les principales informations sur la plante choisie;
- Une méthodologie qui fournira brièvement les différents protocoles utilisés pour aboutir aux résultats qui seront bien illustrés dans la partie résultats et discussions;
- Une conclusion qui résumera les résultats les plus marquants de notre travail et dans laquelle quelques perspectives seront proposées.

Synthèse
bibliographique

I. Présentation du caroubier

Ceratonia siliqua L. est un arbre xérophyte et commun dans les pays méditerranéens, généralement connu sous le nom de caroubier (**Polunin et Huxley, 1972**). Le genre *Ceratonia* appartient à la sous-famille des Caesalpinioïdæ et la famille des Fabaceae (Légumineuses) (**Quezel et Santa, 1963**). Autre que *Ceratonia siliqua*, il existe deux autres espèces: *Ceratonia oreothauma* qui est natif d'Arabie (Oumane) et *Ceratonia somalensis* originaire du nord de la Somalie (**Battle et Tous, 1997**).

L'étymologie scientifique du caroubier silique dérive du mot grec keras, les graines uniformes sont utilisées comme unité de poids par les bijouteries (2g), le carat (**Battle et Tous, 1997**).

I.1. Description botanique

Le caroubier est un arbre sclérophylle (**Zohary et Orshan, 1959; Folch et Guillen, 1981**) à croissance lente (**Biner et al., 2007; Bouzouita et al., 2007**) atteignant 10 m de hauteur. Il déploie un système racinaire pivotant, qui peut toucher 18 m de profondeur (**Aafi, 1996**). Les feuilles sont composées de plusieurs folioles (Fig. 01), la taille moyenne de la feuille est de 10 à 20 cm de longueur (**Mitrakos, 1988**). Les fleurs sont de petite taille (6 à 16 mm de longueur), spiralées et réunies (Fig. 01). Le fruit ou appelé communément la gousse est volumineux, il est vert puis il devient brun au moment de la maturité, ce dernier présente un tissu pulpeux, sucré (la chaire), rafraîchissant renfermant des graines brunes qui représentent soit 10 à 20 % du poids de la gousse, ce rapport varie en fonction de cultivar et du climat (**Rejeb, 1995**).

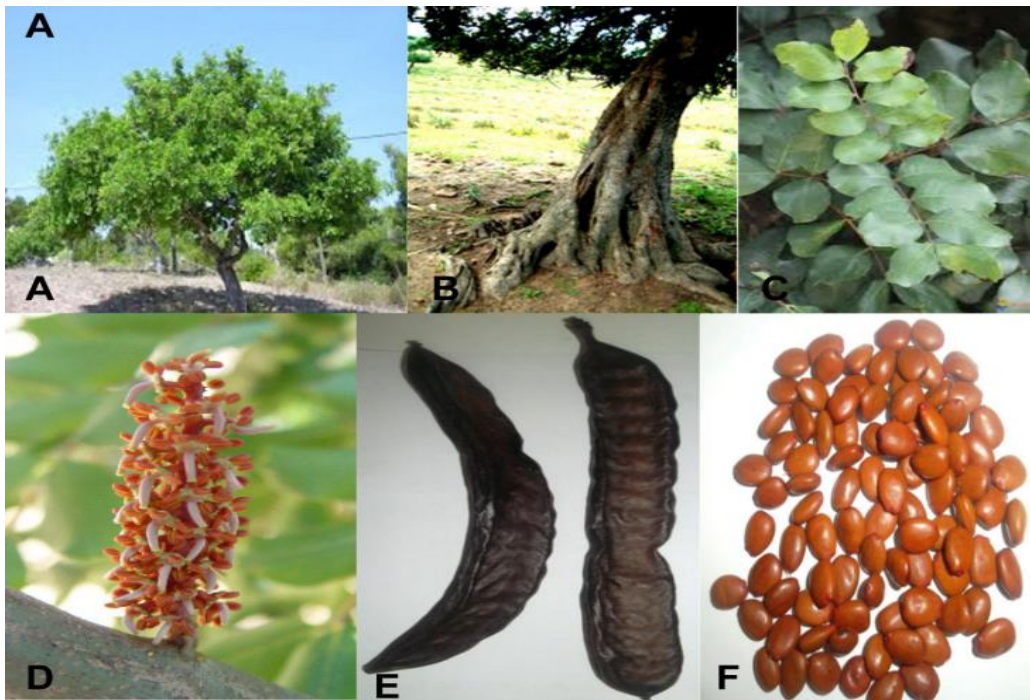


Figure n°01. Appareils végétatif et reproducteur de caroubier. (A. Port général de l'arbre ; B. Écorce ; C. Feuille ; D. Fleurs mâle et femelle ; E. Fruits matures « gousse » ; F. Graines) (Kaderi et *al.*, 2015).

I.2. Répartition géographique

Selon **Hariri et al. (2009)**, le caroubier est originaire du Moyen-Orient principalement du côté de la méditerranée, il est d'un grand intérêt écologique et industriel **Hariri et al. (2009)**. Il se localise en peuplements naturels ou en plantations artificielles (**Emberger et Marie, 1941; Baumel et al., 2018**). Il pousse à l'état naturel en Espagne, au Portugal, au Maroc, en Grèce, en Italie, en Turquie, en Algérie, en Tunisie, en Égypte, et en Chypre. Il a été importé aussi en Australie, en Afrique du Sud, aux États-Unis et en Amérique du Sud (Fig.02) (**Sbay et Abrouch, 2006**).

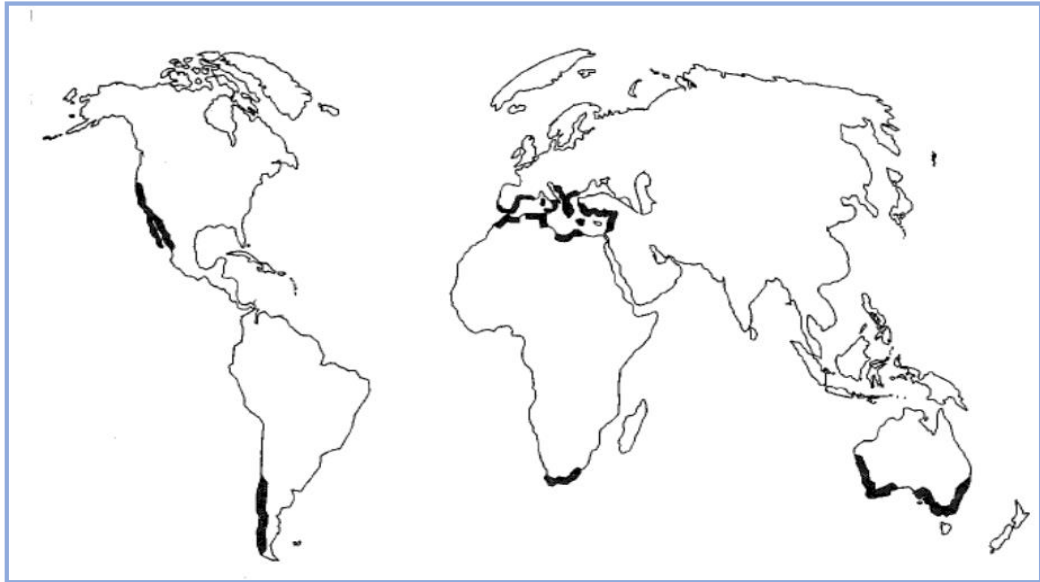


Figure n°02. Distribution du caroubier dans le monde (Battle et Tous, 1997).

I.3. Écologie

Le caroubier silique est une espèce qui se développe dans l'étage humide, subhumide et semi-aride (Benmahioul et al., 2011), elle est très résistante à la sécheresse (200 mm de pluie/an) mais pas au froid (0° C minimum), cette espèce est héliophile et thermophile (Rankou et al., 2017). Elle s'adapte à plusieurs types de sols, mais souvent rencontrée sur les sols pauvres à pH de 6,2 jusqu'à 8,6 mais elle craint les sols acides et hydromorphes (Baum, 1989; Sbay et Abrouch, 2006).

I.4. Reproduction biologique

Le nombre de chromosomes chez le caroubier est $2n=24$ (Barracosa et al., 2007). Il peut être dioïque (Thomas et Metha, 1983) et rarement monoïque (Linskens et Scholten, 1980) et il existe parfois des formes hermaphrodites (Romano et al., 2002). Le pollen des fleurs est transporté par les insectes, généralement des abeilles ou des mouches (Retana et al., 1990), mais aussi par le vent (Pasoos de Carvalho, 1988; Battle et Tous, 1990). Le mode de multiplication végétatif le plus recommandé est le greffage. Il est utilisé à la suite des semis pour surgreffer les pieds mâles par les femelles. Les plants sont greffés un ou deux ans après leur germination dans une pépinière puis transplantés dans des vergers (Battle et Tous, 1997).

En 1981, **Louçao et Barrueco** ont réalisé les premières expériences de multiplication, *in vitro*, du caroubier, suivis par **Sebastian et Mccomb** (1986) puis par **Alorda** (1987) (**Alorda et al., 1987**).

I.7. Domaines d'utilisation du caroubier

Ceratonia siliqua L. est utilisée dans différents domaines: industrie agroalimentaire, pharmaceutique et diététique grâce à son contenu en composées phénoliques qui lui confèrent plusieurs rôles: elle capte les radicaux libres, elle facilite la digestion et elle baisse le taux de cholestérol dans le sang (**Owen et al., 2003; Makris et Kefalas, 2004**).

Dans le domaine agroalimentaire, la pulpe sucrée de la caroube est souvent utilisée comme nourriture du bétail (**Ait chitt et al., 2007**). Les gousses sont employées surtout dans la préparation des jus sucrés, du chocolat, des biscuits et aussi comme remplaçant du cacao (**Berrougui, 2007**). En ce qui concerne le domaine pharmaceutique, l'utilisation des feuilles du caroubier améliore la digestibilité et la qualité nutritive grâce aux tanins contenus dans les feuilles (**Priolo et al., 2000**). De plus, les feuilles ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée (**Baytop, 1984**). Ajouté à cela, l'huile essentielle du caroubier possède des propriétés anti microbiennes et cytotoxiques, elle est très employée dans le traitement des infections (**Ben hsouna et al., 2011**). Alors pour le domaine industriel, la gomme de caroube est utilisée en tant que additif pour les applications dans l'industrie à savoir la papeterie, le cosmétique, le textile (**Biner et al., 2007; Dakia et al., 2007; Vendruscola et al., 2009**). Ainsi, le bois du caroubier dur est de couleur rouge, il est destiné pour la menuiserie et pour la fabrication du charbon (**Hariri et al., 2009**).

I.8. Composition chimique du caroubier

Le caroubier est considéré comme « l'or noir » grâce à ses nombreux intérêts pour la santé et à sa valeur nutritionnelle (Tab. I). La pulpe de caroube a une teneur élevée en sucre qui est comprise entre 30 et 60 %; les sucres les plus présents sont le saccharose, le fructose et le glucose (**Petit et Pinilla, 1995**), elle est considérée comme une bonne source des polyphénols principalement les tanins (**Batlle et Tous, 1997**) et de protéines mais elle est

pauvre en lipides d'après les auteurs. La gousse de caroube contient des quantités appréciables de fibres (Thomson, 1971; Shawakfeh et Ereifej, 2005). De plus, des acides aminés ont été révélés présents dans les extraits des gousses : deux (tyrosine et phénylamine) ont été rapporté par Charalamabous et Papaconstantinou (1966) et cinq acides aminés (alanine, glycine, leucine, proline et valine) ont été mis en évidence par Orphanos et Papaconstantinou, (1969). En 1996, une analyse minéralogique sur la pulpe du caroubier a été investiguée par Puhan et Wielinga (Tab. I).

Tableau I. Composition en minéraux (Puhan et Wielinga, 1996)

Les minéraux	(En mg/100g de pulpe)
K	1100
Ca	307
Mg	42
Na	13
Cu	0,23
Fe	104
Mn	0,4
Zn	0,59

II. Métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires jouent un rôle crucial dans la protection des plantes vis-à-vis de différents stress environnementaux (Fadel et al., 2011). Parmi lesquelles les polyphénols qui présentent divers avantages pour la santé humaine en vue les bioactivités qu'ils possèdent telles que l'activité antioxydante, l'activité anti-inflammatoire, l'activité anticancéreuse (Wan et al., 2021; Farha et al., 2022). Les polyphénols se désignent par l'existence d'un ou plusieurs cycles aromatiques et deux ou plusieurs groupes hydroxyles qui se localisent largement dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines de plantes (Paulo Farias et al., 2021).

D'après leur structure chimique, les polyphénols sont classés en 5 grandes classes, dont l'acide phénolique (acide hydroxybenzoïque, acide hydroxycinnamique), les flavonoïdes, les tanins. Les deux dernières classes ont fait l'objet de notre travail.

II.1. Flavonoïde

Les flavonoïdes font partie de la classe des polyphénols, ils sont de faible poids moléculaire. La structure chimique de base des flavonoïdes est le squelette structurel C6-C3-C6 (Fig. 03), elle est constituée de deux cycles benzéniques liés par un troisième cycle hétérocyclique contenant un cycle pyrone contenant de l'oxygène (Czeczot, 2000). Les flavonoïdes sont présents dans la majorité des légumes, des fruits et ils sont considérés comme des compléments alimentaires pour promouvoir la santé et prévenir les maladies.

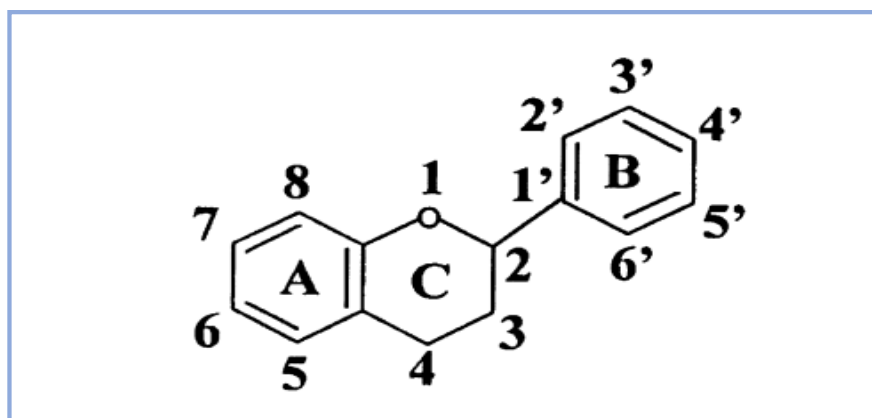


Figure n° 03. Structure nucléaire des flavonoïdes (Cook et Samman, 1996).

II.2. Tanins

Les tanins sont des composés complexes dont le poids moléculaire varie de 500 Da à 30 000 Da, ils sont responsables du goût amer et l'astringence, ils sont répartis dans tout le règne végétal. Ils sont principalement classés en deux groupes, à savoir les tanins condensés et les tanins hydrolysables (Sharma *et al.*, 2021).

a) Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des polymères d'acide gallique ou d'acide ellagique (gallo et ellagitanin) (Fig.04) estérifiés à une molécule centrale, généralement du glucose ou un polyphénol tel que la cathéchine (Farha *et al.*, 2020).

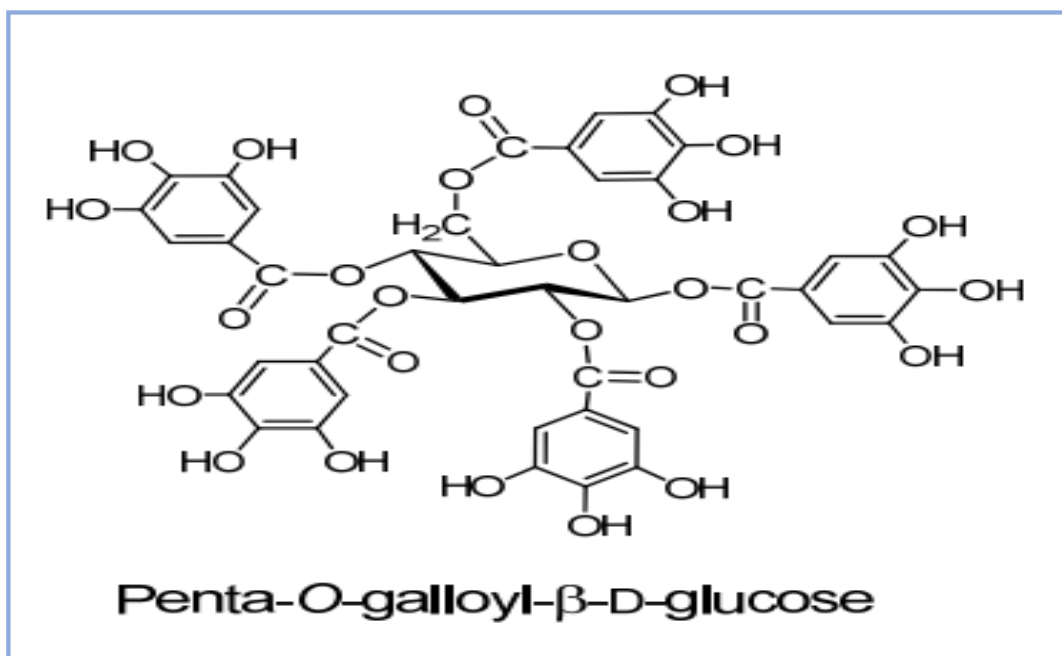


Figure n° 04. Structure des tanins hydrolysables (Takuo et Hideyuki, 2011).

b) Tanins condensés

Ils sont des polyphénols appartenant à la famille des tanins. Ce sont des oligomères ou des polymères d'unités de flavonoïdes. L'unité de base (ou monomère) des tanins condensés est un flavan-3-ol (cathéchine) liés par des liaisons de type C-C (Type B) ou C-O-C (type A) (Figure 05) (Harvey et Allan, 1992; Bruneton, 1999).

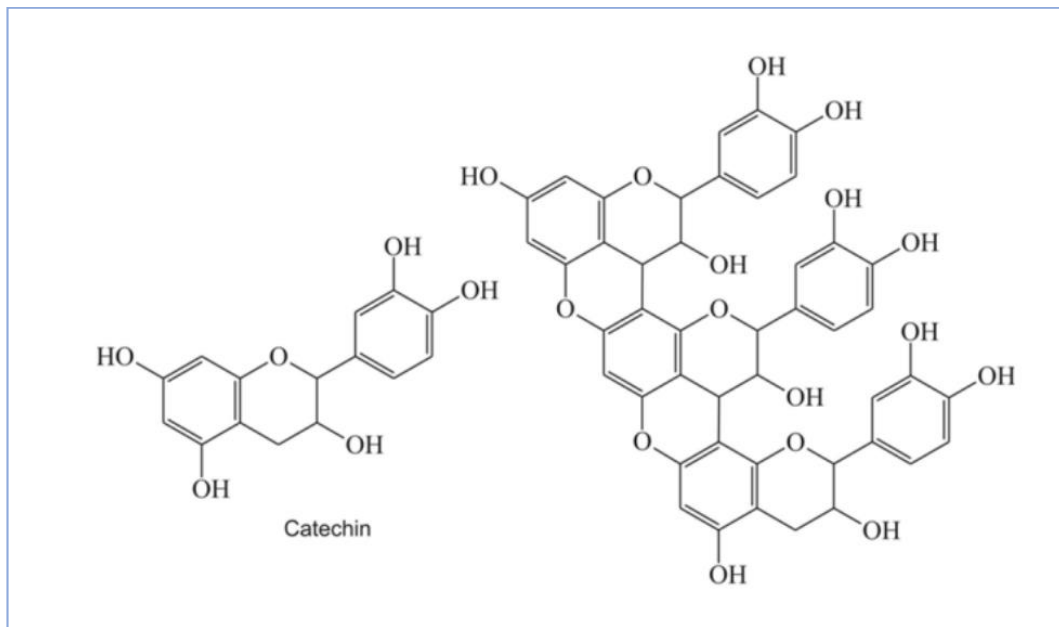


Figure n° 05. Principales formes des tanins condensés (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992).

III. Métabolites secondaires du caroubier

Plusieurs études ont été effectuées sur la caractérisation phytochimique du caroubier, nous citons quelques unes réalisées sur la composition phénolique des différentes parties: dans les gousses (Italie) (Avallone et al. 1997), dans les graines (Italie) (Custódio et al., 2011) et dans les feuilles (Algérie) l'étude de (Mebirouk-Boudechichen et al., 2014)

De plus, les études réalisées sur les métabolites secondaires du caroubier ont montré des variations selon l'origine géographique, la partie analysée, les méthodes utilisées pour l'extraction des polyphénols ou leur détermination et aussi la variété (Marakis, 1996). Tel qui l'a été confirmé par Marakis et al. (1993) qui ont montré que les variétés sauvages sont plus riches en tanins que les variétés cultivées.

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre travail est les feuilles de *Ceratonia siliqua*.

I.1. Echantillonnage

Notre étude est réalisée sur des échantillons récoltés dans deux régions (Bejaia et Jijel) (Fig. 06).



Figure n° 06. Image satellitaire de la station d'étude (ANIREF, 2018).

Dans chacune des deux régions, l'échantillonnage a été réalisé dans trois stations, situées à différentes altitudes (Tab. II), nous avons choisi des stations caractérisées par une abondance du caroubier : *Ceratonia siliqua* L. qui a fait l'objet de notre travail dans lequel nous avons traité les feuilles matures (Bejaia: F1, F2, F3 ; Jijel: f1, f2, f3) de l'espèce (Fig. 07).

Tableau II. Altitude des stations d'étude

Région	Référence des échantillons aux stations	Altitude
Bejaia	Station d'échantillonnage de F 1	375 m
	Station d'échantillonnage de F 2	100 m
	Station d'échantillonnage de F 3	480 m
Jijel	Station d'échantillonnage de f 1	20 m
	Station d'échantillonnage de f 2	30 m

	Station d'échantillonnage de f 3	40 m
--	----------------------------------	------

A l'air libre les échantillons sont mis à sécher durant 25 jours à obscurité jusqu'à ce que le poids se stabilise.



Figure n° 07. Un échantillon des feuilles avant et après séchage (Photo originale Farhi-Bouadam , 2023).

Une fois les échantillons sont séchés, ils sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisés par un tamis de diamètre (250 μ m). La poudre récupérée est ensuite conservée dans des flacons opaques puis gardée au frais. Cette dernière est utilisée pour l'extraction des composés polyphénoliques.

II. Méthodes

II.1. Extraction des composés phénoliques

Dans ce travail la méthode d'extraction utilisée est celle d'Oomah (2011). Mélanger 0,8 g du broyat végétal dans 32 ml d'éthanol ensuite agiter pendant 2 heures à température ambiante puis procéder à une centrifugation pendant 10 min à 3000 tours/min et enfin filtrer et conserver le surnageant dans des flacons opaques.

II.1.1. Dosage des polyphénols totaux

Selon la méthode citée par **Skerget et al. (2005)**, le dosage des polyphénols totaux a été effectué par le réactif colorimétrique Folin- Ciocalteu.

Mélanger 500 µl d'extrait dilué avec 2500 µl folin- ciocalteu dilué (1/10), réalisé une agitation et incubation pendant 03 min, ajouté 2000 µl de Na₂CO₃ (7,5%) suivie d'une incubation pendant 5 min dans un bain marie à 50°C et enfin mesuré l'absorbance à 760 nm.

Un témoin a été préparé en parallèle de la même manière en remplaçant l'extrait par 500 µl de l'éthanol.

A partir de la courbe d'étalonnage, les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique. ce dernier est le standard le plus souvent utilisé dans la méthode au Folin-Ciocalteu (**Maisuthisakul et al., 2008**).

II.1.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) cité par (**Quettier-Deleu et al., 2000; Chang et al., 2002**) est utilisée pour doser les flavonoïdes.

Un mélange 1000 µl d'extrait dilué avec 1000 µl d'AlCl (2%), incubé pendant 10 min, la mesure de l'absorbance est effectué a 430 nm.

Le calcule des concentrations des flavonoïdes a été réalisé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par la Quercétine à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent de Quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/gms).

II.1.3. Dosage des tanins

II.1.3. 1. Dosage des tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables réagissent avec le chlorure ferrique et donnent une coloration

bleue mesurée par spectrophotométrie (**Biaye, 2002**). Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/gms).

Un volume de 1 ml de l'extrait est ajouté à 3,5 ml FeCl (0,01 M) dans HCl (0,01 M), ensuite mesuré l'absorbance à 660 nm.

II.1.3. 2. Dosage des tanins condensés

La méthode à la vanilline décrite par **Deshpande et al. (1986)** est utilisée pour le dosage des tanins condensés. Leurs concentrations sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec la cathéchine. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent de cathéchine par gramme de matière sèche (mg EC/gms).

Un volume de 1 ml d'extrait est ajouté à 5 ml de vanilline HCl (24%) ensuite incubé pendant 20 min à 30°C et enfin l'absorbance est effectuée à 500 nm.

II.1.3.3. Dosage des proanthocyanidines

Les proanthocyanidines sont des composés non hydrolysables mais qui peuvent être dépolymérisés dans un milieu acide à chaud libérant ainsi le cyanidol. Ces composés sont généralement amorphes, solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants organiques apolaires (**Quettier-Deleu et al., 2000**).

Selon **Vermerris et Nicholson (2006)**, la concentration de proanthocyanidines est exprimée en équivalent de la cyanidine.

$$C = \frac{A \cdot M_m}{\hat{l} \mu. l} \quad (mg)$$

Avec :

- **C**: la concentration de proanthocyanidines en mg/ml ;
- **ϵ** : coefficient d'extinction molaire de la cyanidine (34700 L mol⁻¹cm⁻¹) ;
- **M_m** : masse molaire de la cyanidine (égale à 287,24g/mol) ;
- **l** : largeur de la cuve en cm (égale à 1 cm) ;

- A: l'absorbance de l'échantillon.

Mélanger 500 µl d'extrait dilué dans 3000 µl de n-butanol ensuite ajouté 100 µl de la solution $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ à 2% préparée dans du HCl 2N, agité et incubé dans le bain marie à 90°C pendant 20 min. La lecture des absorbances est faite à 550 nm.

II.2. Evaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro*

Quatre méthodes ont été choisies pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

II.2.1. Test de réduction du fer

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique est développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{+2}) (Zubia et al., 2007).

Nous avons utilisé la méthode décrite par Zubia et al. (2007)

Un mélange composé de 1ml d'extrait avec 2,5 ml du tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1% ce mélange est incubé dans le bain marie pendant 20 min à 50°C. Un volume de 2,5 ml de cette solution est mélangé avec 2,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10 % et ensuite centrifugé pendant 10 min une fraction de 2,5 ml du surnageant est mélangée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml chlorure ferrique ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à 0,1% après incubation pendant 10 min à température ambiante l'absorbance du mélange est mesurée à 700 nm.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent BHA.

II.2.2. Test de Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette

stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule (**Brand-Williams et al., 1995**).

Le test de DPPH est réalisé selon le protocole décrit par **Bektas et al. (2005)** 50 µl de chaque extrait sont ajoutés à 2500 µl de solution de DPPH [] incubée pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm.

Deux standards ont été préparés pour l'expression et la comparaison des résultats dont BHA, acide ascorbique.

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I %) a été calculée de la manière suivante:

$$I \% = [(A \text{ témoin} - A \text{ échantillon}) / A \text{ témoin}] \times 100$$

II.2.3. Test de piégeage du radical libre ABTS^{•+}

L'ABTS est un radical libre de coloration bleu-vert, il se réduit en ABTS d'une coloration transparente par piégeage d'un proton par l'antioxydant (**Re et al., 1999**).

Un volume de 2 ml de la solution d'ABTS est mélangée avec 200 µl d'extrait, procéder à une agitation et incubation du mélange pendant 7 min à l'obscurité, la mesure des absorbances est effectuée à 734 nm.

Le standard de référence utilisé pour évaluer l'activité antioxydante est le BHA. Le pourcentage de l'activité scavenging de l'ABTS de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité scavenging de l'ABTS}^{\bullet+} = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

- A_C : Absorbance du contrôle.
- A_T : Absorbance du test.

II.2.4. La chélation du fer

Dans le test de chélation des ions Fe^{2+} , la ferrozine réagit avec les ions bivalents pour former un complexe violet ou rouge très soluble dans l'eau. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de la couleur (**Huang et al., 2005**).

La chélation du fer ferreux a été estimée selon le protocole de **Wang et al. (2009)**. Un volume de 200 μl d'extrait est mélangé avec 100 μl de FeCl_2 à 2 mM ensuite agité et incubé le mélange pendant 2 min la première lecture des absorbances est réalisée à 562 nm. Un volume de 40 μl de la Ferrozine à 5 mM sont ajoutés au mélange laissés réagir pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité la deuxième lecture des absorbances est effectuée à 562 nm contre un blanc préparé sans ferrozine.

Le standard EDTA est utilisé comme chélateur de référence. Le pourcentage de chélation du fer est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{Chélation} = \frac{[(\text{Abs C}) - (\text{Abs Ech} - \text{Abs B})]}{\text{Abs C}} * 100$$

Abs C : Absorbance du contrôle. **Abs Ech** : Absorbance d'échantillon **Abs B** : Absorbance du blanc

III. Analyse statistique

Toutes les manipulations ont été réalisées en trois répétitions, les résultats sont exprimés en Moyenne \pm Écart type. Les résultats obtenus sont soumis à une analyse statistique en utilisant le logiciel XLSTAT 2023. Une analyse de la variance et un test de Tukey ont été effectués pour la comparaison des moyennes entre les extraits des échantillons au niveau des différents dosages et les tests de l'activité antioxydante. De plus, des éventuelles corrélations, entre les différents dosages et les activités antioxydantes testées, ont été mises en évidence par le test de corrélation de Pearson.

Résultats et discussion

I. Résultats du dosage des composés phénoliques

I.1. Résultats du dosage des polyphénols totaux

Les résultats obtenus lors du dosage des polyphénols totaux sont schématisés dans la figure n° 18.

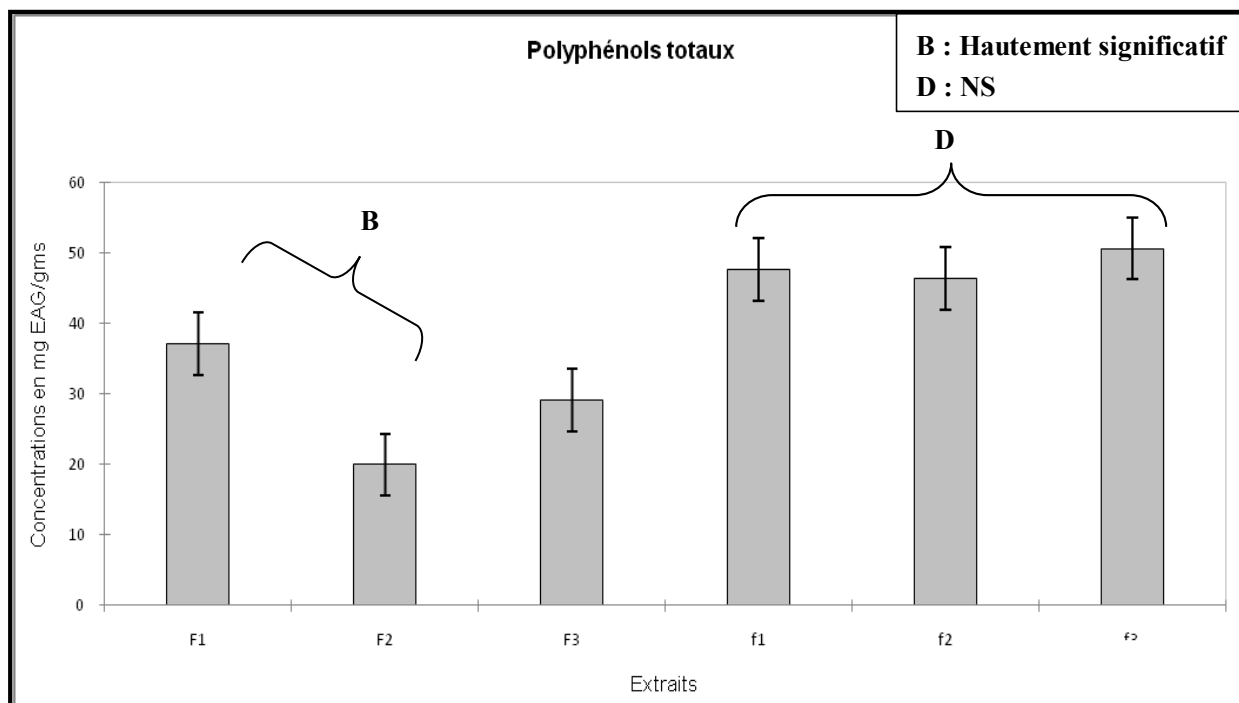


Figure n° 18. Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits des différents échantillons de *Ceratonia siliqua* L. provenant des deux régions (F1- F2-F3 : échantillons de Bejaia ; f1-f2-f3: échantillons de Jijel).

Les résultats montrent que toutes les feuilles présentent des quantités plus ou moins considérables en polyphénols totaux (Fig. 18). En effet, les extraits des feuilles issues de Jijel (f1, f2 et f3) ont exprimé des teneurs élevées en polyphénols totaux à savoir: f3 (50,63 ± 2,44 mg EAG/gms), f1 (47,68 ± 2,45 mg EAG/gms) et f2 (46,37 ± 7,05 mg EAG/gms).

Tandis que les extraits des feuilles provenant des stations de Bejaia correspondant à F1, F2, F3 ont présenté des teneurs inférieures à ceux de Jijel : F1 (37,15 ± 2,61 mg EAG/gms) suivi par F3 (29,14 ± 1,31 mg EAG/gms) puis par F2 (19,98 ± 1,92 mg EAG/gms).

Les résultats que nous avons obtenus sont supérieurs à ceux d'**Avallone et al. (1997)** qui ont enregistré 19 ± 3 mg EAG/gms de polyphénols totaux dans les échantillons de la gousse de caroube récolté en Italie, il sont aussi supérieurs a ceux de **Dallali et al. (2018)** ($2,5 \pm 0,14$ mg EAG/gms), ($4,38 \pm 0,17$ mg EAG/gms) et ($6,45 \pm 0,22$ mg EAG/gms) testés sur les feuilles de *Ceratonia siliqua* de Tunisie récoltés au niveau de trois sites différents.

Nos résultats indiquent que la teneur en polyphénols totaux varie d'un site à un autre. En effet ces variations sont probablement dues aux facteurs climatiques et environnementaux (température, altitude, précipitation), la zone géographique, la sécheresse, des arbres attaqués par des agents pathogènes (**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**).

Le test de signification de Tukey a montré que d'abord pour les échantillons provenant de Jijel, les teneurs en polyphénols totaux ne présentent aucune différence significative entre les trois extraits, au niveau de signe de signification $\alpha= 0.05$, alors que pour ceux échantillonnés dans la région de Bejaia, seuls les extraits F1 et F2 qui sont trouvés différents hautement significatifs ($p < 0,001$).

De plus, le test a indiqué que les polyphénols totaux sont significativement différents dans les extraits des deux régions (Tab. III).

I.2. Résultats du dosage des flavonoïdes

Les quantités des flavonoïdes exprimées en milligramme équivalent de quercétine sont présentées dans la figure n° 19.

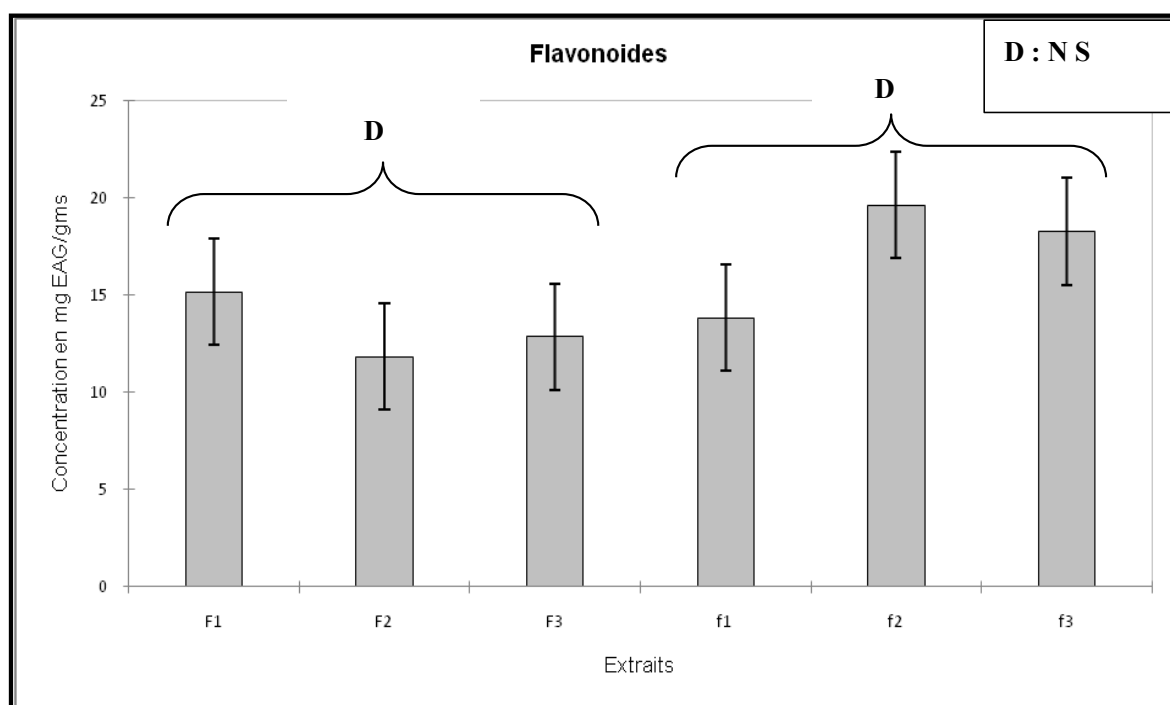


Figure n° 19. Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des différents échantillons de *Ceratonia siliqua* L. provenant des deux régions (F1- F2-F3 : échantillons de Bejaia ; f1-f2-f3: échantillons de Jijel).

A partir de la figure n° 19, nous avons constaté que les extraits de f2 de Jijel ont marqué la plus forte teneur en flavonoïde ($19,63 \pm 3,09$ mg EQ/gms), ensuite les extraits de f3 ($18,25 \pm 1,45$ mg EQ/gms), puis les extraits de f1 avec la valeur de $13,82 \pm 1,35$ mg EQ/gms.

Comme pour les polyphénols totaux, les extraits des feuilles provenant de Bejaia contiennent des quantités en flavonoïdes inférieures à ceux de Jijel dont toujours c'est les extraits de F1 ($15,15 \pm 2,35$ mg EQ/gms) qui révèlent la plus élevée des teneurs par rapport aux autres : F3 ($12,83 \pm 2,86$ mg EQ/gms) et F2 ($11,82 \pm 1,07$ mg EQ/gms).

Les résultats de cette étude pour tous les échantillons, sont inférieurs à ceux rapportés par **Abidar et Boiangiu (2020)** qui ont dosé les flavonoïdes dans les extraits aqueux ($25,35 \pm 0,124$ mg EQ/gms) des feuilles de *Ceratonia siliqua* L. collectée dans le sud du Maroc (Tafaoute).

Une autre étude menée par **Anis et Trigui (2015)**, sur les extraits des feuilles de la caroube de Chebba (Mahdia, Tunisie), en utilisant différents solvants d'extraction (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, eau), a montré que les teneurs en flavonoïdes diffèrent selon le solvant d'extraction utilisé, où ils étaient très concentrés dans les extraits d'acétate d'éthyle ($193,30$ mg EQ/gms $\pm 3,07$) ensuite dans les extraits de dichlorométhane ($75,94$ mg EQ/gms $\pm 7,68$) puis dans les extraits aqueux ($21,71$ mg EQ/gms $\pm 8,71$).

D'après le travail de **Dallali et al. (2018)** réalisé sur les feuilles de *Ceratonia siliqua* L. collectée dans trois sites différents dans la région Nord-Est de la Tunisie, la teneur en flavonoïde variait de $3,42 \pm 0,55$ à $7,42 \pm 0,22$ mg EQ/gms. Leurs résultats sont inférieurs à ceux révélés dans nos extraits.

Cette différence dans les teneurs en flavonoïdes de notre étude et les autres pourrait être attribuée à plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction et la méthode de quantification (**Locatelli, Travaglia , 2010**). Les facteurs génétiques et les conditions de croissance de la plante peuvent jouer aussi un rôle important dans la synthèse des métabolites secondaires (**Islam et al., 2003**).

Le test de signification de Tukey indique que pour les échantillons de la même région, les concentrations en flavonoïdes n'expriment aucune différence significative au niveau de signe de signification $\alpha = 0.05$. Néanmoins, le test indique que la teneur en flavonoïdes est hautement significative entre les extraits des deux régions (Tab. IV).

I.3. Résultats du dosage des tanins hydrolysables

Les résultats du dosage des tanins hydrolysables dans les extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L. issues de différentes stations sont résumés dans la figure n° 20.

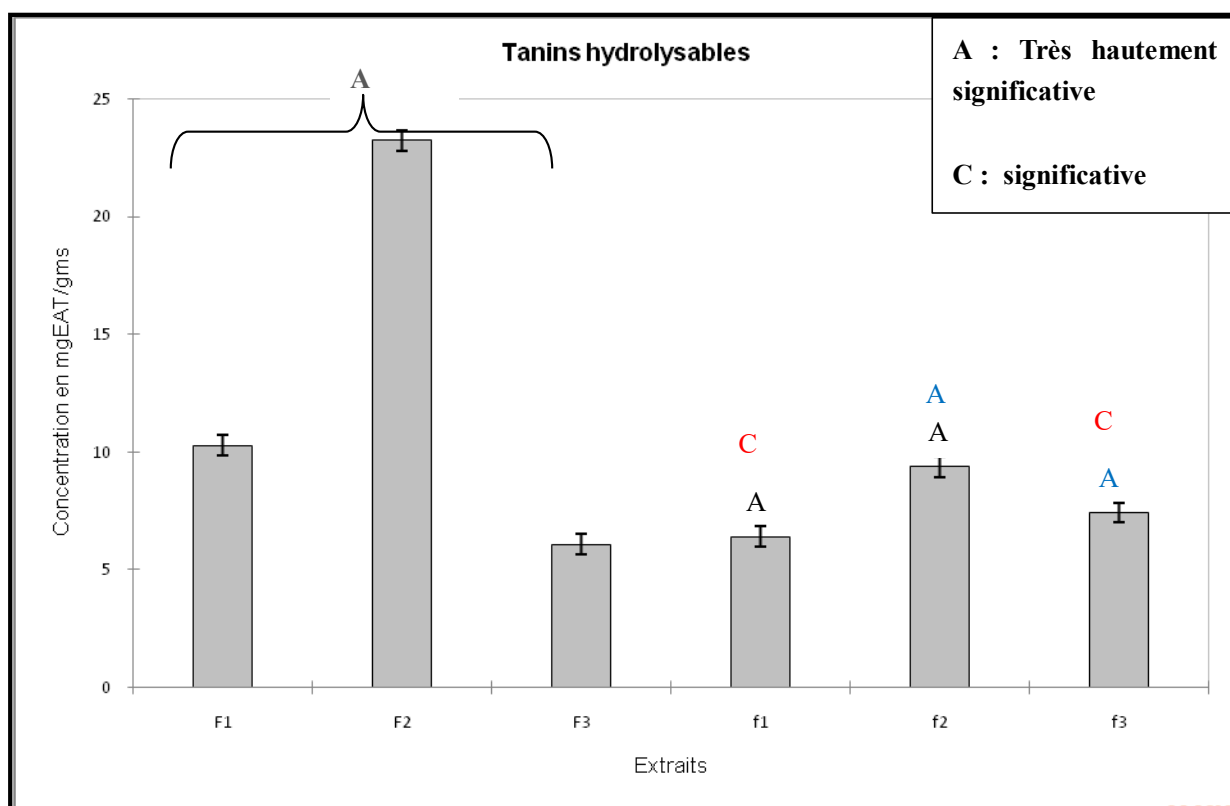


Figure n° 20 . Teneurs en tanins hydrolysables dans les extraits des différents échantillons de *Ceratonia siliqua* L. provenant de deux régions (F1- F2-F3 : échantillons de Bejaia ; f1-f2-f3: échantillons de Jijel).

Selon les résultats mentionnés dans la figure n° 20, nous avons remarqué que c'est dans les extraits de F2 ($23,23 \pm 0,43$ mg EAT/gms) de Bejaia que les tanins hydrolysables sont présents en teneurs élevées par rapport aux autres extraits, et dans les extraits de F3 ($6,06 \pm 0,08$ mg EAT/gms), de la même région, que cette classe de composés phénoliques est faiblement quantifiée.

Dans les extraits des feuilles de Jijel, sont ceux de f2 ($9,37 \pm 0,16$ mg EAT/gms) qui ont enregistré la valeur la plus importante par rapport aux autres extraits des feuilles de la même région. Par ailleurs, les concentrations en tanins hydrolysables dans les extraits de f3 ($7,41 \pm 0,55$ mg EAT/gms) ne sont pas trop loin de celles qui sont estimées dans ceux des f1 ($6,41 \pm 0,29$ mg EAT/gms).

D'après les comparaisons réalisées entre les deux régions, en terme des moyenne, on conclu que les extraits des feuilles de Bejaia sont riches en tanins hydrolysables ($13,19 \pm 0,25$ mg EAT/gms) par apport aux extraits des feuilles de Jijel ($7,73 \pm 0,33$ mg EAT/gms).

Les résultats obtenus en tanins hydrolysable dans notre étude (Fig.20) sont supérieurs à ceux obtenus par **El Kahkahi et al. (2015)** qui ont travaillé sur la pulpe ($0,05 \pm 0,01$ mg/g) et les graines ($0,05 \pm 0,05$ mg/g) du caroubier de Maroc.

Le test de signification, au niveau de $\alpha = 0.05$, de Tukey décèle des différences très hautement significatives dans les concentrations en tanins hydrolysables entre tous les échantillons issus de Bejaia. Hors, pour les extraits provenant de Jijel, la différence est juste significative, elle est enregistrée uniquement entre les extraits f1-f2 et les extraits f2-f3, et significatifs entre f1 et f3.

En outre, le teste indique que la concentration des tanins hydrolysables est très hautement significative entre les extraits des deux régions (Tab.V).

I.4. Résultats du dosage des tanins condensés

Dans la figure ci-dessous sont illustrés les résultats du dosage des tanins hydrolysables dans les extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L.

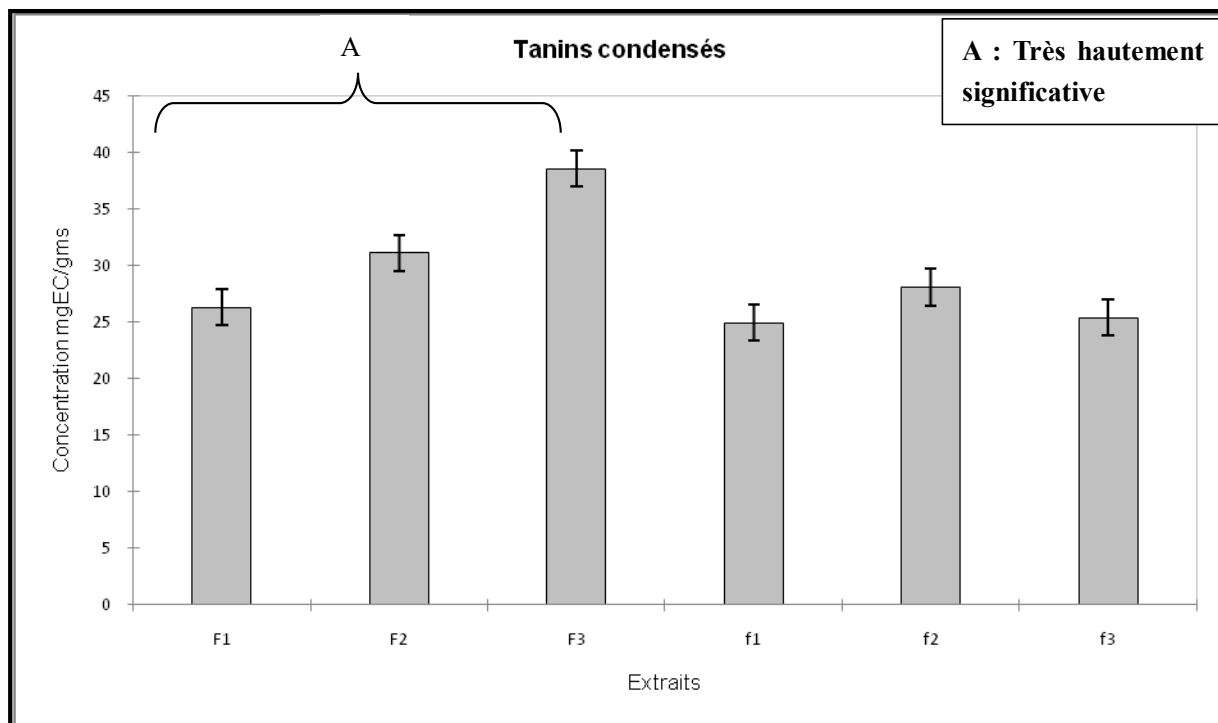


Figure n° 21. Teneurs en tanins condensés dans les extraits des différents échantillons de *Ceratonia siliqua* L. provenant de deux régions (F1- F2-F3 : échantillons de Bejaia ; f1-f2-f3: échantillons de Jijel).

D'après la figure au dessus qui résume les résultats de l'analyse quantitative des tanins condensés, dans les extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L. nous avons remarqué que les extraits de F3 de Bejaia ont fourni la teneur la plus élevée en tanins condensés ($38,56 \pm 0,31$ mg EC/gms), suivis en deuxième position ceux de F2 ($31,09 \pm 1,94$ mg EC/gms), puis une teneur réduite dans les extraits de F1 ($26,28 \pm 2,08$ mg EC/gms).

En ce qui concerne les extraits des feuilles de Jijel, les résultats montrent aussi qu'ils présentent des quantités considérables en tanins condensés, mais inférieures à celles trouvées dans les extraits de Bejaia, où nous avons constaté que les extraits de f 2 sont les plus riches en tanins condensés ($28,06 \pm 0,45$ mg EC/gms) suivis par ceux de f 3 ($25,37 \pm 0,9$ mg

EC/gms) puis une faible concentration a été enregistrée dans les extraits de f 1 ($24,92 \pm 0,64$ mg EC/gms).

Alors, de nos comparaisons, nous déduisons que les extraits des feuilles de Bejaia présentent des quantités plus élevées en tanins condensés en comparaison avec ceux des feuilles Jijel.

Nos résultats (Fig.21) sont inférieurs à ceux de **Bruno-Soares et Abreu (2003)** qui ont révélé des teneurs plus importantes en tanins condensés dans les gousses récoltées au Portugal (54 g). De plus, nos résultats sont comparables à ceux indiqués dans l'étude de **Kamalak et al. (2012)** dans laquelle les tanins condensés sont quantifiés à 27,8 à 148,2 g. dans les gousses du févier d'Amérique récoltées dans plusieurs sites en Turquie.

Les différences constatées lors des comparaisons pourraient être dues aux solvants utilisés tel qu'il a été démontré dans l'étude de **Karamać et al. (2007)** qui ont mis en évidence l'efficacité des solvants (eau, méthanol, éthanol, eau-éthanol, eau-méthanol, acétone, eau-acétone, diméthyl-formamide-eau) dans l'extraction des composés phénoliques pour différentes espèces appartenant à la famille des fabacées. Les auteurs ont montré que l'acétone à 80% assure une extraction complète des tanins condensés jusqu'à 45% d'extrait brute.

D'après le test de signification de Tukey, d'abord pour les échantillons provenant de Bejaia, les teneurs en tanins condensés sont très hautement significatives entre les trois extraits, au niveau de signe de signification $\alpha = 0.05$ (Tab.VI), contrairement aux échantillons de Jijel, ils ne présentent aucune différence de significative en tanins condensés. De plus, le test a indiqué que les concentrations en tanins condensés sont différentes très hautement significatives entre les deux régions.

I.5. Résultats du dosage des proanthocyanidines

Les résultats du dosage des proanthocyanidines dans les extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L. issues des différentes stations sont résumés dans la figure n° 22.

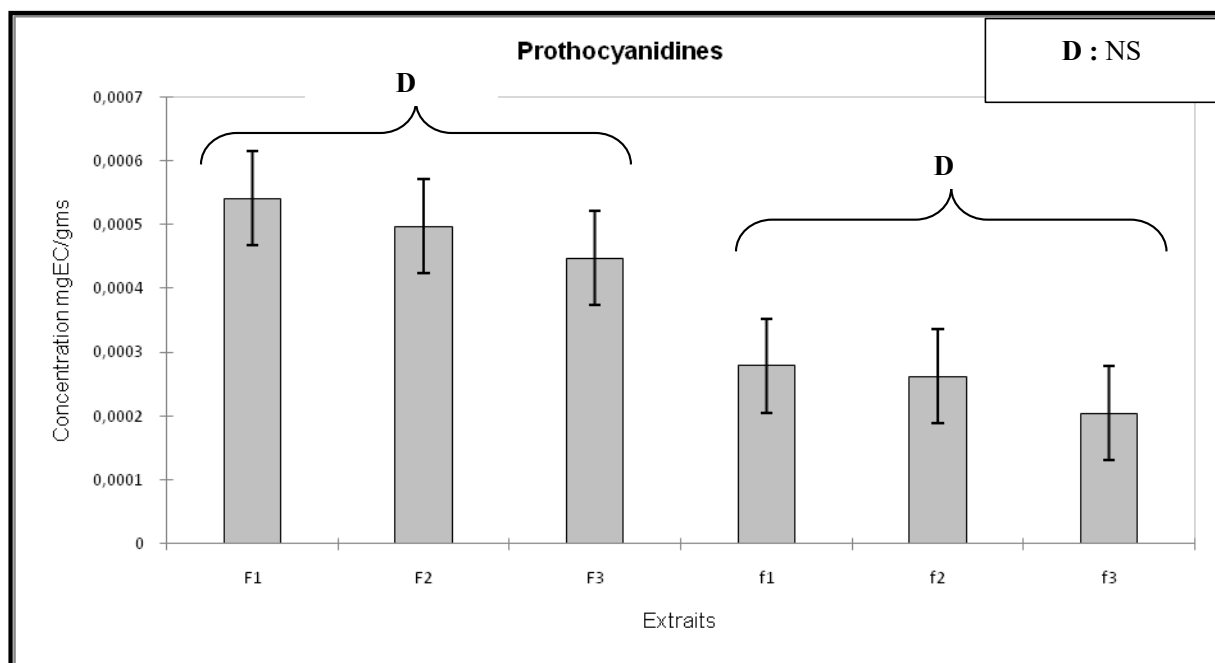


Figure n° 22. Teneurs en proanthocyanidines dans les extraits des différents échantillons de *Ceratonia siliqua* L. provenant de deux régions (F1-F2-F3: échantillons de Bejaia; f1-f2-f3: échantillons de Jijel).

A partir des résultats indiqués dans la figure n° 22, nous avons constaté que les teneurs en proanthocyanidines dans les extraits des feuilles de Bejaia sont très faibles dont les valeurs obtenues sont F1 (0,00054 ± 7,69 × 10⁻⁵ mg EC/gms), suivies par les extraits de F2 (0,00049 ± 7,21 × 10⁻⁵ mg EC/gms) puis une faible quantité dans ceux de F3 (0,00044 ± 3,79 × 10⁻⁵ mg EC/gms).

Les extraits des feuilles de Jijel ont exprimé des quantités encore minimales en proanthocyanidines où les extraits de f1 ne renferment que 0,00027 ± 3,13 × 10⁻⁵ mg EC/gms et ceux de f2 que 0,00026 ± 5,63 × 10⁻⁵ mg EC/gms et enfin une concentration de l'ordre 0,00020 ± 6,21 × 10⁻⁵ mg EC/gms a été enregistrée dans les extraits de f3.

Nos résultats concernant les proanthocyanidines sont plus faibles par rapport à ceux rapportés par **Avallone et al. (1997)** qui ont travaillé sur les extraits des gousses de caroube récolté en Italie. Les auteurs ont montré que les teneurs varient selon le solvant utilisé pour l'extraction : extrait acétonique 70% (2,9 mg); extrait méthanolique (1,4 mg)

Nos résultats sont inférieurs à ceux indiqués dans le travail d'**Amessis-Ouchemoukh et al. (2017)** dans la gousse ($140 \pm 5,47$ mg CE/100g) de caroube collecté à Bejaia (Ighil-Yesli). Et à ceux de **Kumazawa et al. (2002)** dosés dans la gousse ($1,36 \pm 0,01$ g/100g) de caroubier de la Grèce.

A partir des résultats révélés par le test de signification de Tukey (Tab.VII), nous avons constaté que les teneurs en proanthocyanidines ne présentent aucune différence significative entre les extraits des échantillons issus de la même région (que se soit pour Bejaia ou pour Jijel) au niveau de signe de signification $\alpha = 0.05$. D'une autre part, le test montre que la différence dans les teneurs en proanthocyanidines est hautement significative entre les extraits des deux régions.

II. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante dans les extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L., échantillonnées dans différentes stations, a été évaluée par quatre tests : 02 tests de piégeage des radicaux (DPPH et ABTS) et deux autres de réduction de fer (Pouvoir réducteur et chélation de fer).

II. 1. Résultats du pouvoir réducteur

Les résultats du pouvoir réducteur obtenus dans notre travail sont schématisés dans la figure n° 23.

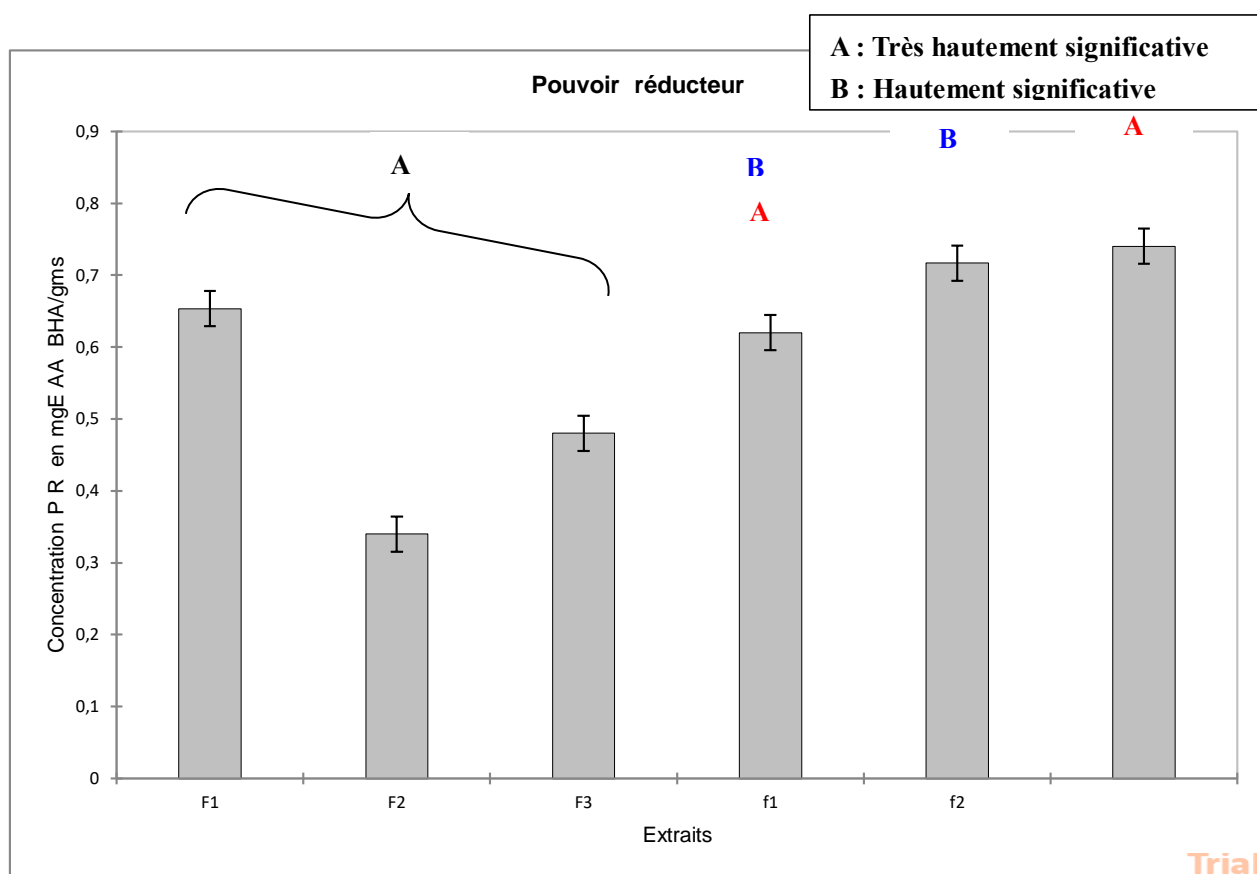


Figure ° 23. Capacité du pouvoir réducteur dans les extraits des différents échantillons de *Ceratonia siliqua* L. provenant de deux régions (F1- F2-F3 : échantillons de Bejaia ; f 1-f 2-f 3 : échantillons de Jijel).

Les résultats révèlent que tous les extraits des feuilles ayant un pouvoir réducteur (Fig. 23). En effet, l'extrait des feuilles f3 de Jijel possède le pouvoir réducteur le plus élevé

($0,74 \pm 0$ mg EBHA/gms), suivi en deuxième position par l'extrait de f2 ($0,71 \pm 0,005$ mg EBHA/gms) et un pouvoir réducteur intermédiaire est enregistré dans l'extrait de f1 ($0,62 \pm 0,04$ mg EBHA/gms). Alors que les extraits des feuilles de Bejaia notent une faible capacité antioxydante liée au pouvoir réducteur dont $F1=0,65 \pm 0,01$ mg EBHA/gms, suivis de $F3=0,48 \pm 0,02$ mg EBHA/gms et enfin $F2= 0,34 \pm 0$ mg EBHA/gms.

La figure n° 23 indique aussi que les extraits des feuilles de Jijel ayant un pouvoir réducteur plus élevé par rapport aux extraits des feuilles de Bejaia.

Les résultats de notre étude sont inférieurs à ceux obtenus dans l'étude de **Ben Ayache et al. (2020)** qui ont travaillé sur les graines ($0,73 \pm 0,1$ mg) et la pulpe ($0,66 \pm 0,00$ mg) de *Ceratonia siliqua* L. qui pousse en Tunisie.

Néanmoins, ils sont beaucoup supérieurs à ceux indiqués dans l'étude **Habibatni (2018)** sur les extraits de la plante *Spartuim junceum* (Fabaceae) récoltée à Constantine où les auteurs ont rapporté les valeurs de $10,83 \mu\text{g}$ et de $14,52 \mu\text{g}$ dans respectivement les extraits des tiges et ceux des fleurs. Selon **Macheix et al. (2006)**, l'activité antioxydante varie selon l'espèce étudié ou encore les organes de la plante testés (**Khadhri et al., 2013**).

Le test de signification de Tukey (Tab.VIII), révèle des différences très hautement significatives, au niveau des concentrations du pouvoir réducteur, entre les extraits des trois échantillons de Bejaia. Par ailleurs, les extraits des feuilles originaires de Jijel expriment un pouvoir réducteur différent hautement significatif notamment entre les extraits de f3 et de f1 et entre ceux de f2 et de f1. De plus, le teste indique que l'expression du pouvoir réducteur dans les feuilles des deux régions d'étude est très significatif, au niveau de signe de signification $\alpha= 0.05$.

II. 2. Résultats de piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydante évaluée par le test de DPPH est exprimée sous forme du pourcentage d'inhibition, ces derniers sont présentés dans la figure n° 24.

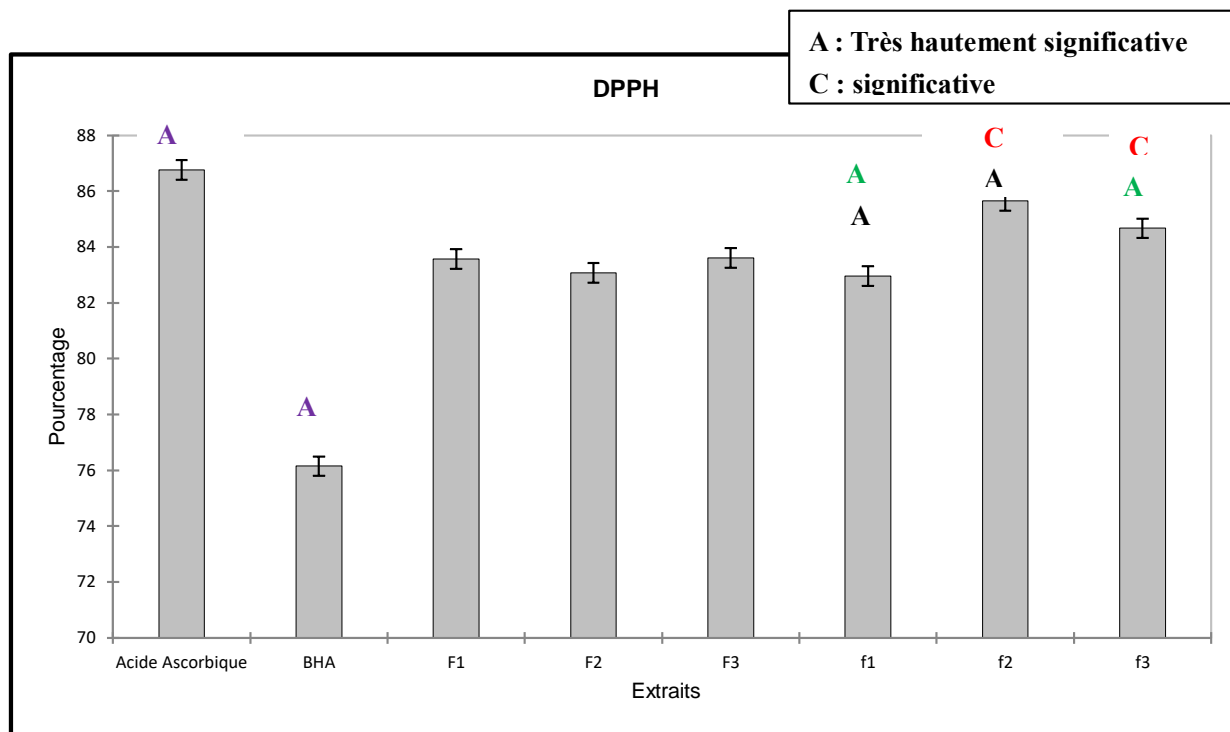


Figure ° 24 . Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans les extraits des différents échantillons de *Ceratonia siliqua* L. provenant de deux régions (F1- F2-F3 : échantillons de Bejaia ; f 1-f 2-f 3 : échantillons de Jijel) .

Les résultats synthétisés dans la figure, au dessus, indiquent que pour les échantillons de Jijel, ce sont les extraits de f2 qui présentent le pourcentage d'inhibition le plus élevé (85,65%) par apport aux extraits de f3 (84,67%) et ceux de f1 (82,96%).

Par ailleurs, le DPPH a été piégé par les extraits de Bejaia à des pourcentages d'inhibitions plus ou moins proches : extraits de F3 (83,61%) suivi de ceux de F1 (83,57%) puis ceux de F2 (83,08%).

Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH révèlent que tous les extraits testés ont un effet antioxydant (Fig. 24).

Nos résultats sont supérieurs à ceux d'**El Hajaji et al. (2011)** qui ont testé l'activité des extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L. collectées au Nord Ouest du Maroc, les auteurs ont rapporté des pourcentages d'inhibition qui varient de 1,17% à 61,17 %.

Les résultats obtenus dans notre travail sont en accord avec celle d'**Amessis-Ouchemoukh et al. (2017)** qui ont mis en évidence le pourcentage d'inhibition du radical DPPH dans les extraits de la gousse de caroube de Bejaia où le pouvoir d'inhibition de leur extrait était de $82,45 \pm 0,23\%$.

D'autre part, le pourcentage d'inhibition (92,14%) indiqué dans l'étude menée par **Abidar et al. (2020)** sur l'extrait aqueux des feuilles de *Ceratonia siliqua* du Maroc est supérieur à ceux de notre travail (Fig.11). La variation de l'activité antioxydante pourrait être attribuée à plusieurs raisons telles que la solubilité des composés phénoliques qui sont directement liées au type de solvant utilisés (**Amessis-Ouchemoukh et al., 2014**).

Le test de signification de Tukey a indiqué que dans le cas des extraits des échantillons provenant de Bejaia, le teste DPPH n'a présenté aucune différence significative entre les échantillons de cette région, Alors que ceux échantillonnés à Jijel, ils sont différents très hautement significatifs ($p < 0,0001$) au niveau du test de DPPH. De plus, l'activité des deux standards (acide ascorbique et BHA) présente des différences très hautement significatives avec tous les extraits testés (Tab.IX).

II.3. Résultats de piégeage du radical d'ABTS

Les pourcentages d'inhibition d'ABTS sont présentés dans la figure n° 25.

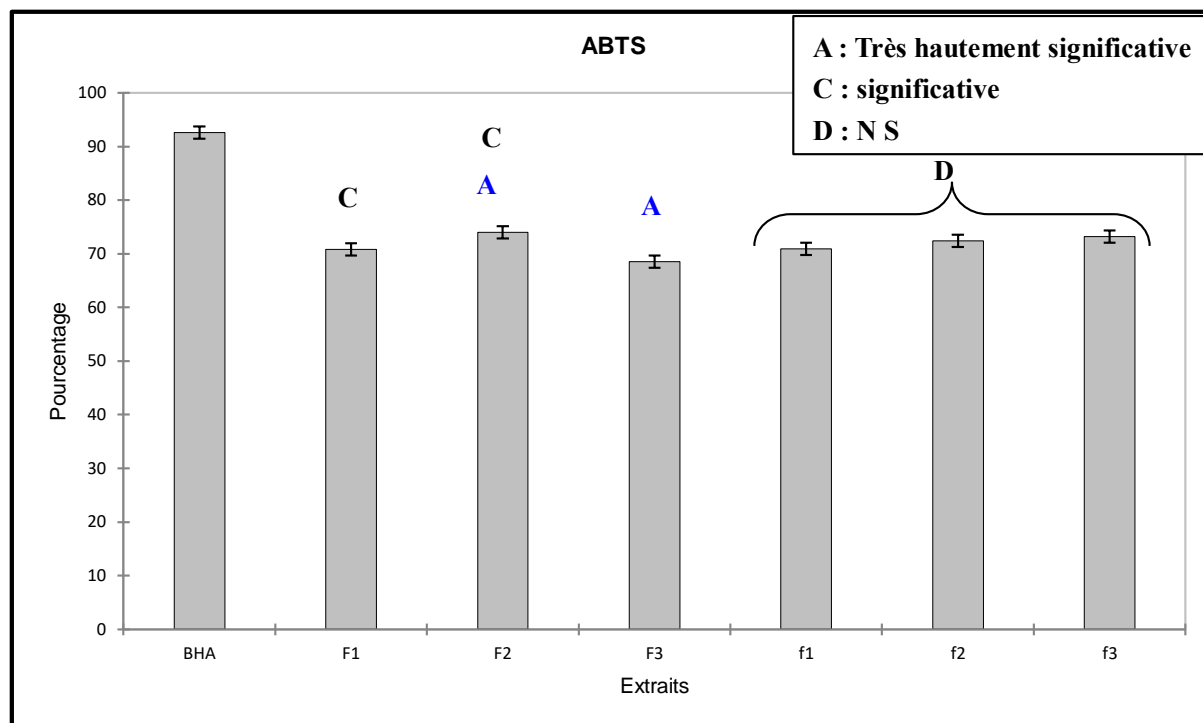


Figure ° 25. Le pourcentage d'inhibition du radical libre d'ABTS dans les extraits des différents échantillons de *Ceratonia siliqua* provenant de deux régions (F1- F2-F3 : échantillons de Bejaia ; f 1-f 2-f 3 : échantillons de Jijel)

A partir des résultats obtenus dans notre travail (Fig. 25), nous constatons que tous les extraits de nos échantillons ont un effet antioxydant considérable. Cependant, les extraits des feuilles de Jijel ont montré une meilleure activité antioxydante avec un rapport d'inhibition égale: à 73,17% pour les extraits de f3, à 72,44% pour les extraits de f2, puis à 70,87% pour ceux de f1.

De même, les extraits provenant de Bejaia expriment une forte activité antioxydante de piégeage du radical ABTS dont le pourcentage d'inhibition le plus haut est enregistré par les extraits de F2 (74,00%), suivi des extraits de F1(70,85%) et ceux de F3 (68,57%). Le résultat du taux d'inhibition d'ABTS constaté dans les extraits des feuilles de Jijel est légèrement

élevé à celui estimé dans les extraits des échantillons de Bejaia.

Les résultats obtenus dans notre travail sont assez proches de ceux rapportés par **Custodio et al. (2011)** qui ont testé l'activité radicalaire d'ABTS sur l'extrait des graines et celui des fruits murs de *Ceratoni siliqua* L. échantillonnée dans la région d'Algarve (Portugal) dans cinq cultivars femelles différents, les auteurs ont évalué des pourcentages d'inhibition qui varient, selon la région de récolte, de $68,4 \pm 6,8\%$ à $85,4 \pm 3,6\%$.

De plus, nos résultats sont inférieurs à ceux constatés dans les extraits aqueux des graines (95,8%) et de la pulpe (90,9%) de la caroube de Tunisie (**Ben Ayache et al., 2020**). Le même constat avec ceux rapportés dans le travail d'**Amessis-Ouchemoukh et al. (2017)** sur les extraits des gousses (81,51%) de la caroube de Bejaia.

Par ailleurs, nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par **Aubin et al. (2020)** qui ont testé l'activité de piégeage du radical de l'ABTS dans les extraits des feuilles de *Dalbergia hostilis* ($39,87 \pm 2,51\%$) et *Uraria picta* ($75,19 \pm 7,89\%$) de la famille des Fabacées, qui poussent en Cote d'ivoire.

Selon le test de signification de Tukey, il n'y a aucune différence significative entre les extraits des échantillons issus de Jijel dans activités liée a l'ABTS. Tandis que dans le cas de ceux échantillonnés à Bejaia, une différence très hautement significative ($p < 0,0001$) est enregistrée entre les extraits de F2 et ceux de F3. De plus, la différence entre l'activité antioxydante fournie par le standard BHA et les extraits des feuilles est très hautement significative (Tab. X).

II.4. Résultats de la chélation de Fer

Les résultats du pourcentage d'inhibition du chélateur de fer estimés dans les extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L. issues de différentes stations sont résumés dans la figure n° 26.

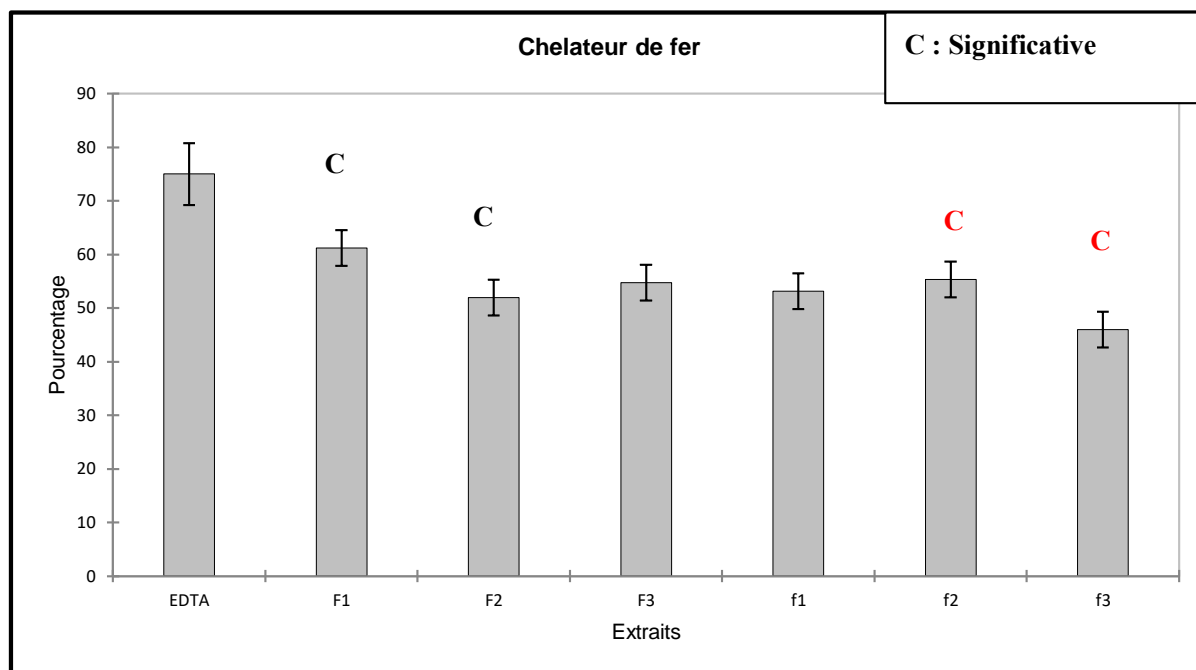


Figure ° 26 . Le pourcentage des chélateurs de fer dans les extraits des différents échantillons de *Ceratonia siliqua* L. provenant de deux régions (F1- F2-F3 : échantillons de Bejaia ; f 1-f 2-f 3 : échantillons de Jijel).

Selon les résultats mentionnés dans la figure n° 26, l'effet chélateur de fer est très important dans les extraits des feuilles de Bejaia dont le pourcentage de chélation est de 61,21% dans F1, de 54,78% et 51,92% dans F3 et F3 respectivement. En ce qui concerne les extraits des échantillons provenant de Jijel, le pourcentage exprimant la chélation de fer varie de 45,99% à 55,32% dans les extraits de f3 et f2 respectivement.

Nos résultats sont trop inférieurs d'abord à ceux constatés par **Abidar et al. (2020)** qui ont testé l'activité chélatrice de fer dans les extraits des feuilles (94,96 %) de *Ceratonia siliqua* du Maroc. Ensuite à ceux indiqués dans le travail d'**Amessis-Ouchemoukh et al. (2017)** dans les extraits de gousses (73,17 %) du caroubier de Bejaia.

Le test de signification de Tukey a montré que tout d'abord pour l'échantillon F2 provenant de Bejaia ne présente aucune différence significative avec les échantillons de Jijel dans le test de la chélation de fer. Ce qui est le contraire pour les extraits de F1 et F3. A l'intérieur de la même région, des différences significatives ont été constatées entre les extraits de F1 et ceux de F2 et entre les extraits de f2 et ceux de f3. De plus, la différence dans l'activité antioxydante par la chélation de fer est très hautement significative entre l'EDTA et les extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L. (Tab.XI).

II. 5. Résultats du test de corrélation de Pearson

Plusieurs auteurs ont montré que les activités anti- radicalaires des plantes sont en relation avec la teneur de ces dernières en composés phénoliques, parmi ces auteurs on trouve **Ydjedd et al. (2017)**, **Amessis-Ouchemoukh et al. (2017)**, **Belmokhtar (2015)**, **Khorasani Esmaili et al. (2015)**, **Mohammed et al. (2014)**, **Annegowda et al. (2013)**. Ceci a été constaté aussi dans les résultats de corrélation de Pearson de notre travail.

Le test de corrélation a décelé plusieurs corrélations (Tab.XII)

- Significatives et positives entre les polyphénols totaux et les flavonoïdes ($r=0,664$);
- Significatives et négatives entre les polyphénols totaux et les tanins condensés ($r= -0,632$) et entre les polyphénols totaux et les tanins hydrolysables ($r= -0,686$);
- Significatives et positives entre les tanins hydrolysables et l'activité de piégeage du radical ABTS ($r= 0,594$);
- Significatives et positives entre les flavonoïdes et l'activité de piégeage de DPPH ($r=0,769$);
- Une corrélation parfaite entre tous les composés phénoliques dosés et l'activité de pouvoir réducteur, les corrélations sont positives et significatives avec les polyphénols totaux et les flavonoïdes ($r= 0,890$; $r= 0,754$ respectivement) et négatives et significatives avec les tanins hydrolysables ($r= -0,622$) et condensés ($r= -0,687$);
- Significatives et positives entre l'activité de piégeage de radical de DPPH et l'activité du pouvoir réducteur ($r=0,655$);
- Absence de tout type de corrélation significative entre les composés phénoliques et l'activité de chélatrice de fer.

Tableau XII : Résultats de test de corrélation de Pearson

Variables	PPT	FLAV	T C	T H	ABTS	Chel Fer	DPPH	P R
PPT	1	0,664	-0,632	-0,686	0,059	-0,192	0,454	0,890
FLAV		1	-0,378	-0,352	0,368	-0,143	0,769	0,754
T C			1	0,083	-0,436	0,114	-0,152	-0,622
T H				1	0,594	-0,024	-0,276	-0,687
ABTS						-0,445	0,250	0,031
Chel Fer						1	-0,131	-0,050
DPPH							1	0,655
P R								1

PPT: Polyphénols totaux; FLA: Flavonoïdes; T C: Tanins condensés; T H: Tanins hydrolysables; ABTS: Activité de piégeage du radical ABTS; Chel Fer: Activité de chélation de fer; DPPH: Activité de piégeage du radical DPPH; P R : Activité du pouvoir réducteur.

Conclusion

La flore Algérienne est dotée d'une biodiversité considérable, elle est composée de nombreuses plantes parmi lesquelles les plantes médicinales, ces dernières sont caractérisées par leur richesse en métabolites secondaires sources des principes actifs qui sont utilisés aujourd'hui à des fins thérapeutiques et pharmacologiques.

Ceratonia siliqua L. est l'une de ces plantes médicinales, qui est utilisée pour ses valeurs nutritives ainsi que pour ses effets thérapeutiques tels qu'ils ont été rapportés dans la bibliographie.

L'objectif de notre travail est d'abord, de quantifier et de comparer entre la quantité des principales classes des composés phénoliques dans les extraits des feuilles échantillonnées dans différentes stations situées dans deux régions d'étude, puis de mettre en évidence le pouvoir antioxydant de ces extraits. Sachant que les stations choisies, notamment pour la région de Jijel, n'ont pas été fait l'objet d'une étude phytochimique antérieur.

Les résultats obtenus dans notre travail ont révélé la présence de quantités considérables de trois composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins condensés) parmi les cinq qui ont été dosés.

Les feuilles issues de Jijel ont enregistré des teneurs moyennes élevées en polyphénols totaux (48,22 mg EAG/gms), et en flavonoïdes (17,23 mg EQ/gms) par rapport à celles échantillonnées à Bejaia (28,75mg EAG/gms de polyphénols totaux et 13,26 mg EQ/gms de flavonoïdes).

Par contre, les feuilles de Bejaia étaient riches en tanins condensés (31,97 mg EC/gms) et en tanins hydrolysables (13,19 mg EAT/gms) comparativement aux teneurs fournies par les feuilles de Jijel (26,11 mg EC/gms en tanins condensés et 07,73 mg EAT/gms en tanins hydrolysables).

En ce qui concerne les proanthocyanidines, ils ont été détectés à des quantités faibles ($0,00049 \text{ mg EC/gms} \geq \text{pranth} \leq 0,00024 \text{ mg EC/gms}$) dans les feuilles des deux régions.

Selon les résultats de l'activité antioxydante, les feuilles des deux régions ont présenté une capacité élevée de piégeage du radicale DPPH (83,42% et 84,42% pour Bejaia et Jijel respectivement), et une capacité de piégeage du radicale ABTS moindre que la première (71,13% et 72,16% pour Bejaia et Jijel respectivement). Néanmoins, pour l'activité chélatrice

de fer le pourcentage d'inhibition exprimé dans les feuilles des deux régions n'a pas dépassé les 56%. De plus, l'activité réductrice de fer était légèrement importante dans les feuilles de Jijel (0,69 mg EBHA/gms) par rapport à celles de Bejaia (0,49 mg EBHA/gms).

D'une manière générale, se sont les feuilles provenant de Jijel qui ont fournis les meilleurs résultats dans le test de l'activité antioxydante.

D'après le teste de Pearson, il existe des corrélations positives et significatives entre les composés phénoliques dosés dans notre travail.

Le teste de corrélation de Pearson a indiqué également qu'il existe une corrélation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante.

Une corrélation positive et significative ($r=0,890$) entre les polyphénols totaux et le pouvoir réducteur, mais aussi entre les flavonoïdes et le teste de DPPH ($r=0,769$) et entre les flavonoïdes et le pouvoir réducteur ($r=0,754$).

Afin de bien améliorer cette contribution, il serait souhaitable de compléter ces résultats ultérieurement par :

- L'identification des molécules responsables de l'activité antioxydante par des analyses de caractérisation notamment HPLC;
- Faire une analyse pédologique des sites d'échantillonnage pour mettre en évidence les éventuelles causes qui étaient à l'origine des différences observées dans ce travail.
- Comprendre le mécanisme d'action de ces molécules, par des tests de confirmation *in vivo*.

*Références
bibliographiques*

A

Aafi, A. (1996). Note technique sur le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). Centre Nationale de la Recherche Forestière. Rabat (Maroc). 10p.

Abidar, S., Boianjiu, R. S., Dumitru, G., Todirascu-Ciornea, E., Amakran, A., Cioanca, O., ... & Nhiri, M. (2020). The aqueous extract from *Ceratonia siliqua* leaves protects against 6-hydroxydopamine in zebrafish: understanding the underlying mechanism. *Antioxidants*, 9(4), 304

Ait Chitt, M., & Belmir, M. et Lazrak A., 2007. Production des plantes sélectionnées et greffées du caroubier.

Alorda, M., Estades, J., Galmes, J., & Medrano, H. (1987). Promotion of rooting in carob cuttings. *Gartenbauwissenschaft*, 52(1), 31-34.

Amessis-Ouchemoukh, N., Ouchemoukh, S., Meziat, N., Idiri, Y., Hernanz, D., Stinco, C. M., ... & Luis, J. (2017). Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica* L., *Ceratonia siliqua* L. and *Quercus ilex* L. extracts. *Industrial Crops and Products*, 95, 6-17.

Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, LVP, Serralheiro, ML, Araújo, MEM, 2014. Capacité antioxydante et contenu phénolique de certaines plantes médicinales méditerranéennes et leur rôle potentiel dans l'inhibition des activités de la cyclooxygénase-1 et de l'acétylcholinestérase. *Ind. Cultures Product*. 53, 6–15.

Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D. A., Bolling, B., & Wijaya, H. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food chemistry*, 121(4), 1231-1235.

Annegowda, H. V., Bhat, R., Tze, L. M., Karim, A. A., & Mansor, S. M. (2013). The free radical scavenging and antioxidant activities of pod and seed extract of *Clitoria fairchildiana* (Howard)-an underutilized legume. *Journal of food science and technology*, 50, 535-541.

Aubin K, Jules K N, Rémi Constant A, Konan Y, Yao K, Bi George M, Witabouna K M. Antioxidant Activity and Flavonoid Content of Five Plants of the Fabaceae Family Used Against Osteoporosis in Central Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal* January 2020 edition Vol.16: 1857 – 7881.

Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., & Monzani, A. (1997). Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of food composition and analysis*, 10(2), 166-172.

B

Barracosa P, Osoria J, Cravador A. 2007 . Evaluation de la diversité des fruits et des graines et caractérisation des cultivars de caroube (*Ceratonia siliqua* L.) dans la région de l'Algarve. *Sci Hortic* 114 : 250-257.

Battle, I. (1997). Carob tree: *Ceratonia siliqua* L.-Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17 (Vol. 17). Bioversity International.

Battle, I., & Tous, J. (1990). Cultivares autóctonos de algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.) en Cataluña. *Investigación Agraria*, 5(2), 223-238.

Baumel, A., Mirleau, P., Viruel, J., Bou Dagher Kharrat, M., La Malfa, S., Ouahmane, L., ... & Médail, F. (2018). Assessment of plant species diversity associated with the carob tree (*Ceratonia siliqua*, Fabaceae) at the Mediterranean scale. *Plant Ecology and Evolution*, 151(2), 185-193.

Baum, N. (1988). Arbres et arbustes de l'Egypte ancienne: la liste de la tombe thébaine d'Inéni (no 81) (Vol. 31). Peeters Publishers.

Baytop, T. (1999). Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present). Publication of the istanbul University, 312, 2-3.

Bektas, T., Dimitra, D., Atalay, S., Munevver, S., & Moschos, P. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller. *Food Chemistry*, 90, 333-340.

Belmokhtar, Z. (2015). Identification et caractérisation des molécules du métabolisme secondaire de *Retama monosperma*. L Boiss, intérêt pharmaceutique (Thèse de doctorat). Université Mohamed Boudiaf d'Oran.

Ben Ayache, S., Behija Saafi, E., Emhemmed, F., Flamini, G., Achour, L., & Muller, C. D. (2020). Biological activities of aqueous extracts from carob plant (*Ceratonia siliqua* L.) by antioxidant, analgesic and proapoptotic properties evaluation. *Molecules*, 25(14), 3120.

Benmahioul, B., Harche, M. K., & Daguin, F. (2011). Le caroubier, une espèce méditerranéenne à usages multiples. *Forêt méditerranéenne*, 32(1), 51-58.

Berrougui H (2007), Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), une richesse nationale aux vertus médicinales. *Maghreb Canada Express* 5, n°9.

Biaye, M. (2002). Action pharmacologique des tanins. Thèse de Doctorat. Université Cheikh Anta Diop de DAKAR. 57 P.

Biner, B., Gubbuk, H. A. M. İ. D. E., Karhan, M. U. S. T. A. F. A., 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.

Bouzouita, N., Khaldi, A., Zgoulli, S., Chebil, L., Chekki, R., Chaabouni, M. 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.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Lavoisier, Paris, 1120.

Bruno-Soares, A. M., & Abreu, J. M. (2003). Merit of *Gleditsia triacanthos* pods in animal feeding: Chemical composition and nutritional evaluation. *Animal feed science and technology*, 107(1-4), 151-160.

C

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).

Charalamabous, J., & Papaconstantinou, J. (1966). Current result on the chemical composition of the carob bean. the composition uses of carob bean (J. Charalambous, ed.). Cyprus Agricultural Research Institute Ministry of Agriculture and Natural Resources Nicosia, Cyprus.

Cook, N. C., & Samman, S. (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry*, 7(2), 66-76.

Custódio, L., Escapa, A. L., Fernandes, E., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., ... & Romano, A. (2011). Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic activities of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) germ flour extracts. *Plant foods for human nutrition*, 66, 78-84.

Czeczot, H. (2000). Biological activities of flavonoids-a review. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 9(4), 3-13.

D

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.

Dallali, S., Aloui, F., Selmi, H., & Sebei, H. (2018). Comparison of the chemical composition and the antioxidant activity of the leaves of Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) collected in three sites of Djebel Zaghouan (Tunisia). *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, CIRS* (21), 3429-3438.

Deshpande, S. S., Cheryan, M., Salunkhe, D. K., & Luh, B. S. (1986). Tannin analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 24(4), 401-449.

E

Ebrahimi, S. N., Hadian, J., Mirjalili, M. H., Sonboli, A., & Yousefzadi, M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*, 110(4), 927-931.

El Hajaji, H., Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., ... & 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(3), 321-324.

El Kahkahi, R., Zouhair, R., Diouri, M., Ait Chitt, M., & Errakhi, R. (2015). Morphological and biochemical characterization of Morocco carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Int J Biol Med Res*, 6(2), 4946-4952.

Emberger, L., & MAIRE, R. C. J. E. (1941). *Catalogue Des Plantes Du Maroc: Spermatophytes Et Ptéridophytes*. Imprimerie Minerva.

F

Fadel, F., Fattouch, S., Tahrouch, S., Lahmar, R., Benddou, A., & Hatimi, A. (2011). The phenolic compounds of *Ceratonia siliqua* pulps and seeds (Les composés phénoliques des pulpes et des graines de *Ceratonia siliqua*). *Journal of. Materials and Environmental Science*, 2, 285-292.

Farha, A. K., Gan, R. Y., Li, H. B., Wu, D. T., Atanasov, A. G., Gul, K., ... & Corke, H. (2022). The anticancer potential of the dietary polyphenol rutin: Current status, challenges, and perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(3), 832-859.

Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., Li, H. B., Zhu, F., Liu, H. Y., ... & Corke, H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, 38, 100751.

FOLCH I GUILLÉN, R. (1981). *La vegetació dels països catalans*. Ketres Editoria, Barcelona.

G

García-Díez, E., Sánchez-Ayora, H., Blanch, M., Ramos, S., Martín, M. Á., & Pérez-Jiménez, J. (2022). Exploring a cocoa-carob blend as a functional food with decreased bitterness: Characterization and sensory analysis. *LWT*, 165, 113708.

H

Habibatni, S., & Zama, D. (2018). *Etude phytochimique et pharmacologique de deux plantes appartenant à la famille des Astéraceae et Fabaceae* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).

Hariri, A., Ouis, N., Sahnouni, F., & Bouhadi, D. (2009). Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Rev. microbiol. ind. san et environ*, 37-55.

Hsouna, A. B., Trigui, M., Mansour, R. B., Jarraya, R. M., Damak, M., & Jaoua, S. (2011). Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International journal of food microbiology*, 148(1), 66-72.

Hsouna, A. B., Trigui, M., Jarraya, R. M., Damak, M., & Jaoua, S. (2015).

Identification of phenolic compounds by high performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC/MS) and in vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Ceratonia siliqua* leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(14), 479-485.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.

I

Islam, M. S., Yoshimoto, M., Ishiguro, K., Okuno, S., & Yamakawa, O. (2003). Effect of artificial shading and temperature on radical scavenging activity and polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(2), 182-187.

K

Kaderi, M., Ben Hamouda, G., Zaeir, H., Hanana, M., & Hamrouni, L. (2015). Notes ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Ceratonia siliqua* (L.). *Phytothérapie*, 13(2), 144-147.

Kamalak, A., Guven, I., KAPLAN, M., Boga, M., Atalay, A. I., & Ozkan, C. O. (2012). Potential nutritive value of honey locust (*Gleditsia triacanthos*) pods from different growing sites for ruminants.

Karamac, M., Kosinska, A., Rybarczyk, A., & Amarowicz, R. (2007). Extraction and chromatographic separation of tannin fractions from tannin-rich plant material. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 57(4), 471-474.

Khadhri, A., ELMOKNI, R., & SMITI, S. (2013). Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu: *Atractylis gummifera*. *Revue Soc. Sci. Nat de Tunisie*, 39, 44-52.

Khorasani Esmaeili, A., Mat Taha, R., Mohajer, S., & Banisalam, B. (2015). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from in vivo and in vitro grown *Trifolium pratense* L.(Red Clover). *BioMed Research International*, 2015.

Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M. S., & Nakayama, T. (2002). Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(2), 373-377.

L

Linskens H. & Scholten W., 1980. The flower of carob. *Potug. Acta. Bilo.* (A) XVI :95-102

Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J. D., Martelli, A., Stévigny, C., & Arlorio, M. (2010). Total antioxidant activity of hazelnut skin (*Nocciola Piemonte* PGI): Impact of

different roasting conditions. *Food chemistry*, 119(4), 1647-1655.

M

Macheix J.J., Fleuriet A. et Sarni-Manchado P. (2006). Composés Phénoliques dans la Plante-Structure, Biosynthèse, Répartition et Rôles ; in : « Les Polyphénols en Agroalimentaire ». Techniques & Documentation, Lavoisier, Paris. 1-27 p.

Maisuthisakul P., Pasuk S. and Ritthiruang de J.P. (2008). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food composition and Analysis*.21: 229-240.

Makris, D. P., & Kefalas, P. (2004). Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technology and Biotechnology*, 42(2), 105-108.

Marakis, S. (1996). Carob bean in food and feed: current status and future potentials: a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, 33(5), 365-383.

Marakis, S., Lambrakis, M., & Diamantoglou, S. (1993). Tannin chemistry of nine cretan carob varieties. *Chimica Chronica*, 22, 213-224.

Mebirouk-Boudechiche, L., Cherif, M., Boudechiche, L., & Sammar, F. (2014). Teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide d'Algérie. *Revue Méd. Vét*, 165(11), 344-352.

Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.

Mitrakos, K. (1988). La botanique de Cératonie. Actes du II Symposium international de la caroube(P. Fito et A. Mulet, dir.). Valence, Espagne, 209-218.

Mohammed, R. S., Abou Zeid, A. H., El Hawary, S. S., Sleem, A. A., & Ashour, W. E. (2014). Flavonoid constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos* L. leaves. *Saudi journal of biological sciences*, 21(6), 547-553.

Mueller-Harvey, I., & McAllan, A. B. (1992). Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology*, 1, 151-217.

O

Oomah B.D., Corbé A. and Balasubramanian P. (2011). Antioxydant and anti-inflammatory activities of bean hulls. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58: 8225-8230.

Orphanos, P. I., & Papaconstantinou, J. (1969). The Carob Varieties of Cyprus. *Tech. Bull.*, 5.

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

P

Passos de Carvalho, J. 1988. Carob pollination aspects. Pp. 281-289 in Proceedings of the II International Carob Symposium (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain. Pereira, J.F.

de Paulo Farias, D., de Araujo, F. F., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Antidiabetic potential of dietary polyphenols: A mechanistic review. *Food Research International*, 145, 110383.

Petit, M. D., & Pinilla, J. M. (1995). Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 145-152.

Polunin, O., Huxley, A., & Everard, B. (1965). *Flowers of the Mediterranean* (p. 53). London: Chatto and Windus.

Priolo, A., Waghorn, G. C., Lanza, M., Biondi, L., & Pennisi, P. (2000). Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: effects on lamb growth performance and meat quality. *Journal of Animal Science*, 78(4), 810-816.

Puhan, Z., & Wielinga, M. W. (1996). Products derived from carob pods with particular emphasis on carob bean gum (CBG). Report Technical Committee of INEC (unpublished), 12, 123-127.

Q

Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., ... & Trotin, F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*, 72(1-2), 35-42.

Quézel, P., & Santa, S. (1962). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*.

R

Rankou, H., M'Sou, S., Chadburn, H., Rivers, M. C., Ouhammou, A., & Martin, G. J. (2019). *Ceratonia siliqua*. The IUCN Red List of threatened species 2017: e.T202951A112823254.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Rejeb, M. N. (1995). Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration. Quel avenir pour l'amélioration des plantes, 79-85.

Retana, J., Ramoneda, J., & Garcia del Pino, F. (1990). Importancia de los insectos en la polinización del algarrobo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 16, 143-150.

Romano, A., Barros, S., & Martins-Loução, M. A. (2002). Micropropagation of

the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 35-41.

S

Sbay H, Abrouch M (2006) Apport des espèces à usages multiples pour le développement durable : cas du pin pignon et du caroubier, Centre de Recherche Forestière Haut-Commissariat aux eaux et forêts et à la lutte contre la désertification, Rabat, pp.1-9.

Sharma, K., Kumar, V., Kaur, J., Tanwar, B., Goyal, A., Sharma, R., ... & Kumar, A. (2021). Health effects, sources, utilization and safety of tannins: A critical review. *Toxin Reviews*, 40(4), 432-444.

Shawakfeh, K. et Ereifej, KI, (2005). Caractéristiques des gousses de deux variétés de *Ceratonia siliqua* L. de Jordanie. *Ital. J. Food Sci.* 17 (2):187–194 .

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., & Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89(2), 191-198.

T

Takuo O, Hideyuki I (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Relates to Tannins . *Molecules*16, 2191-2217

Thomas, V., & Mehta, A. R. (1983). Effect of phloroglucinol on shoot growth and initiation of roots in carob tree cultures grown in vitro. *Plant Cell Culture in Crop Improvement*, 451-457.

Thomson, P., 1971. Le caroubier en Californie. *Annuaire des producteurs de fruits rares de Californie* 3, 61–102

V

Vendruscolo, C. W., Ferrero, C., Pineda, E. A., Silveira, J. L., Freitas, R. A., Jiménez-Castellanos, M. R., & Bresolin, T. M. (2009). Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: Effect of drying method. *Carbohydrate Polymers*, 76(1), 86-93.

Vermerris, W., & Nicholson, R. (2007). *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media.

W

Wan, M. L. Y., Co, V. A., & El-Nezami, H. (2021). Dietary polyphenol impact on gut health and microbiota. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(4), 690-711.

Y

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

Z

Zohary, M., & Orshan, G. (1959). The maquis of *Ceratonia siliqua* in Israel. *Vegetatio*, 285-297.

Zubia, M., Robledo, D., & Freile-Pelegrin, Y. (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of applied phycology*, 19, 449-458.

Annexes

Tableau III. Résultats de test de signification de Tukey des polyphénols totaux

Contraste	Pr > Diff	Significatif	Contraste	Pr > Diff	Significatif
f3 vs F2	<0,0001	***	f1 vs F3	0,000	***
f3 vs F3	<0,0001	***	f1 vs F1	0,030	*
f3 vs F1	0,005	*	f2 vs F2	<0,0001	***
f1 vs F2	<0,0001	***	f2 vs F3	0,001	**

Tableau IV. Résultats de test de signification de Tukey des flavonoïdes

Contraste	Pr > Diff	Significatif
f2 vs F2	0,009	**
f2 vs F3	0,023	*
f3 vs F2	0,033	*

Tableau V. Résultats de test de signification de Tukey des tanins hydrolysables

Contraste	Pr > Diff	Significatif	Contraste	Pr > Diff	Significatif
F2 vs F3	0,000	***	F1 vs f3	0,000	***
F2 vs f1	0,000	***	f2 vs F3	0,000	***
F2 vs f3	0,000	***	f2 vs f1	0,000	***
F2 vs f2	0,000	***	f2 vs f3	0,000	***
F2 vs F1	0,000	***	f3 vs F3	0,004	**
F1 vs F3	0,000	***	f3 vs f1	0,033	*
F1 vs f1	0,000	***			

Tableau VI. Résultats de test de signification de Tukey des tanins condensés

Contraste	Pr > Diff	Significatif	Contraste	Pr > Diff	Significatif
F3 vs f1	0,000	***	F3 vs F2	0,000	***
F3 vs f3	0,000	***	F2 vs f1	0,001	**
F3 vs F1	0,000	***	F2 vs f3	0,001	**
F3 vs f2	0,000	***	F2 vs F1	0,006	**

Tableau VII. Résultats de test de signification de Tukey des proanthocyanidines

Contraste	Pr > Diff	Significatif	Contraste	Pr > Diff	Significatif
F1 vs f3	0,000	***	F2 vs f1	0,007	**
F1 vs f2	0,001	**	F3 vs f3	0,003	**
F1 vs f1	0,002	**	F3 vs f2	0,021	*
F2 vs f3	0,001	**	F3 vs f1	0,038	*
F2 vs f2	0,004	**			

Tableau VIII. Résultats de test de signification de Tukey du pouvoir réducteur

Contraste	Pr > Diff	Significatif	Contraste	Pr > Diff	Significatif
f3 vs F2	0,000	***	f2 vs F1	0,017	*
f3 vs F3	0,000	***	F1 vs F2	0,000	***
f3 vs f1	0,000	***	F1 vs F3	0,000	***
f3 vs F1	0,002	**	f1 vs F2	0,000	***
f2 vs F2	0,000	***	f1 vs F3	0,000	***
f2 vs F3	0,000	***	F3 vs F2	0,000	***
f2 vs f1	0,001	**			

Tableau IX. Résultats de test de signification de Tukey du DPPH

Contraste	Pr > Diff	Significatif	Contraste	Pr > Diff	Significatif
Acide Ascorbique vs BHA	0,000	***	f2 vs F3	0,000	***
Acide Ascorbique vs f1	0,000	***	f2 vs f3	0,012	*
Acide Ascorbique vs F2	0,000	***	f3 vs BHA	0,000	***
Acide Ascorbique vs F1	0,000	***	f3 vs f1	0,000	***
Acide Ascorbique vs F3	0,000	***	f3 vs F2	0,000	***
Acide Ascorbique vs f3	0,000	***	f3 vs F1	0,005	**
Acide Ascorbique vs f2	0,004	**	f3 vs F3	0,007	**
f2 vs BHA	0,000	***	F3 vs BHA	0,000	***
f2 vs f1	0,000	***	F1 vs BHA	0,000	***
f2 vs F2	0,000	***	F2 vs BHA	0,000	***
f2 vs F1	0,000	***	f1 vs BHA	0,000	***

Tableau X. Résultats de test de signification de Tukey d'ABTS

Contraste	Pr > Diff	Significatif	Contraste	Pr > Diff	Significatif
BHA vs F3	0,000	***	F2 vs F3	0,000	***
BHA vs F1	0,000	***	F2 vs F1	0,013	*
BHA vs f1	0,000	***	F2 vs f1	0,013	*
BHA vs f2	0,000	***	f3 vs F3	0,000	***
BHA vs f3	0,000	***	f2 vs F3	0,002	**
BHA vs F2	0,000	***			

Tableau XI. Résultats de test de signification de Tukey de chélateur de fer

Contraste	Pr > Diff	Significatif	Contraste	Pr > Diff	Significatif
EDTA vs f3	0,000	***	F1 vs f3	0,000	***
EDTA vs F2	0,000	***	F1 vs F2	0,014	*
EDTA vs f1	0,000	***	F1 vs f1	0,034	*
EDTA vs F3	0,000	***	f2 vs f3	0,013	*
EDTA vs f2	0,000	***	F3 vs f3	0,020	*
EDTA vs F1	0,010	*			

Résumé

Résumé

Le caroubier appartient à la famille des Fabacées ayant d'énormes intérêts économiques et écologiques. L'objectif de notre travail est d'abord, de quantifier et de comparer les teneurs de cinq classes des composés phénoliques dans les extraits des feuilles échantillonnées dans différentes stations situées dans la région de Bejaia et de Jijel, puis de mettre en évidence le pouvoir antioxydant des ces extraits.

Les résultats obtenus dans notre travail ont révélé la présence de quantités considérables de trois composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins condensés) parmi les cinq qui ont été dosés.

Les dosages réalisés sur les extraits des feuilles de *Ceratinia siliqua* L. de Bejaia et Jijel ont révélé des teneurs plus élevées en métabolites secondaires dans les extraits des feuilles de Jijel par rapport à celles quantifiées dans les extraits des feuilles de la région de Bejaia.

Les résultats de l'activité antioxydante évaluée par quatre méthodes (DPPH, ABTS, FRAP et le pouvoir chélateur ferrique) ont indiqué que les extraits des feuilles des deux régions sont dotés d'un potentiel antioxydant mesuré par rapport à l'antioxydant standard employé.

Mots clé : Fabacées, *Ceratinia siliqua*, activité antioxydante, composés phénoliques, variation inter stations.

Summary

The carob tree belongs to the family of Fabaceae with enormous economic and ecological interests. The objective of our work is first, to quantify and compare the contents of five classes of phenolic compounds in the extracts of the leaves sampled in different stations located in the region of Bejaia and Jijel, then to highlight the power antioxidant of these extracts.

The results obtained in our work revealed the presence of considerable amounts of three phenolic compounds (total polyphenols, flavonoids, condensed tanins) among the five that were assayed.

The assays carried out on the extracts of the leaves of *Ceratinia siliqua* L. from Bejaia and Jijel revealed higher level sin secondary metabolites in extracts of Jijel leaves by contribution to those quantified in the leaf extracts from the Bejaia region.

The results of the antioxidant activity evaluated by four methods (DPPH, ABTS, FRAP and the ferric chelating power) indicated that the extracts of the leaves of the two regions are endowed with an antioxidant potential measured by contribution to the standard antioxidant used.

Keywords : Fabaceae, *Ceratinia siliqua*, antioxidant activity, phenolic compounds, inter-station variation.

ملخص

تنتمي شجرة الخروب إلى عائلة الفصيلة البقولية ذات المصالح الاقتصادية والبيئية الهائلة. الهدف من عملنا هو أولاً تحديد ومقارنة محتويات خمس فئات من المركبات الفينولية في مستخلصات الأوراق التي تم أخذ عينات منها في محطات مختلفة تقع في منطقة بجاية وجيجل ، ثم إبراز قوة مضادات الأكسدة لهذه المستخلصات.

كشفت النتائج التي تم الحصول عليها في عملنا عن وجود كميات كبيرة من ثلاثة مركبات فينولية (البوليفينول الكلي ، الفلافونويد ، العفص المكثف) من بين الخمسة التي تم فحصها.

أظهرت الفحوصات التي أجريت على مستخلصات أوراق الخروب من بجاية وجيجل وجود محتوى أعلى من المركبات الثانوية في مستخلصات أوراق جيجل مقارنة بتلك التي تم قياسها في مستخلصات أوراق منطقة بجاية.

أشارت نتائج نشاط مضادات الأكسدة التي تم تقييمها بأربع طرق DPPH و ABTS و FRAP وقوة مخلب الحديد إلى أن مستخلصات أوراق المنطقتين تتمتع بقدرات مضادة للأكسدة تقاس بالمساهمة في مضادات الأكسدة القياسية المستخدمة.

الكلمات الدالة : البقولية ، خروب ، النشاط المضاد للأكسدة ، المركبات الفينولية ، الاختلاف بين المحطات.