



UNIVERSITÉ SULTAN MOULAY SLIMANE

**Faculté des Sciences et Techniques
Béni-Mellal**

Centre d'Etudes Doctorales « Sciences et Techniques »
Formation Doctorale « Ressources Naturelles, Environnement et Santé »
En cotutelle avec l'Université d'Angers

THÈSE

Présentée par

BOUTAKIOUT Amale

Pour obtention du grade de

Docteur

Discipline : Sciences Agronomiques

Spécialité : Agroalimentaire

**Etude physico-chimique, biochimique et stabilité d'un nouveau produit : jus de cladode
du figuier de Barbarie marocain (*Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha*).**

Soutenue le 21 juillet 2015 devant la commission d'examen :

Jean-Luc COURTHAUDON, Professeur des Universités, Vice-président délégué à la valorisation scientifique, Université d'Angers, France.

Prédisent

Didier HAUCHARD, MCF HC / HDR, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, France

Rapporteur

Fatima LAMCHOURI, Professeur Habilité, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah – Fès, Faculté Polydisciplinaire de Taza, Maroc.

Rapporteur

Abdelkarim FILALI-MALTOUF, Professeur de l'Enseignement Supérieur / Grade C, Université Mohammed V – Rabat, Maroc.

Examineur

Emira MEHINAGIC, DR-HDR, Enseignante-Chercheur, Responsable GRAPPE, Groupe ESA d'Angers, France.

Examineur

Driss ELOTHMANI, DR-HDR, Enseignant-Chercheur, Groupe ESA d'Angers, France.

Co-Directeur de Thèse

Hafida HANINE, Professeur Habilité C, FST, USMS de Béni Mellal, Maroc.

Directeur de Thèse

Mostafa MAHROUZ, Professeur de l'Enseignement Supérieur, FST, UCA, Marrakech, Maroc

Co-encadrant de Thèse

Bouchra BENAZZOUZ, Professeur des Universités, Université de Kénitra, Maroc.

Invité

Hassan LATRACHE, Professeur des Universités, Université de Béni Mellal, Maroc.

Invité

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes parents

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçoit à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit.

Mon frère

Qui n'a cessé d'être pour moi un exemple de persévérance, de courage et de générosité. Je me permets aujourd'hui de te présenter ma grande reconnaissance.

Tous ceux ou celles qui me sont chers.

Tous mes enseignants tout au long de mes études.

Tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail.

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements aux Directeurs de ma thèse, Pr Driss ELOTHMANI et Pr Hafida HANINE, qui m'ont permis de relever le défi de la cotutelle du Doctorat entre l'Université d'Angers en France et l'Université Sultan Moulay Slimane au Maroc en réalisant et achevant ce travail dans de bonnes conditions.

Ce travail de recherche a été effectué au sein du Laboratoire « GRAPPE » à l'Ecole Supérieure d'Agriculture (E.S.A.) à Angers (France) et du Laboratoire des Bioprocédés et Biointerfaces de la Faculté des Sciences et Techniques (F.S.T.) de Béni Mellal (Maroc). A cet effet, je remercie vivement Madame Frédérique JOURJON, Directrice de la Recherche et de la Valorisation à l'E.S.A. ; Madame Emira MEHINAGIC, Responsable de l'Unité de Recherche GRAPPE à l'E.S.A.; et Monsieur Hassan LATRACHE, Directeur du Laboratoire des Bioprocédés et Biointerfaces à la F.S.T. de Béni Mellal pour m'avoir accueillie dans leurs Laboratoires et pour la confiance qu'ils m'ont accordée.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Hafida HANINE, Professeur à la F.S.T. de Béni Mellal et fut ma Directrice de thèse au Maroc qui a fort aimablement accepté de diriger mon travail. Ses conseils, sa gentillesse et ses grandes connaissances scientifiques m'ont aidée à réaliser ce travail.

Je remercie vivement Monsieur Driss ELOTHMANI, Professeur à l'E.S.A., qui m'a accueillie dans son équipe et fut mon Directeur de thèse en France. Son expérience et sa profonde connaissance de la chimie des produits naturels, les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail m'ont permis de mener à bien cette étude. Je remercie également toute la famille ELOTHMANI : Annie, Amina, Amélie et Kévin de m'avoir accueillie chaleureusement chez eux à mon arrivée en France.

Je remercie également Monsieur Mostafa MAHROUZ, co-encadrant de thèse et Professeur à la F.S.T. de Marrakech de m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherche de l'innovation, du développement durable et de l'expertise dans la chimie verte de la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech, pour ses conseils et ses appuis scientifiques et logistiques en me dirigeant vers Ouled Dlim pour récolter les cladodes du figuier de Barbarie. A cet effet, je remercie la Direction Provinciale de l'Agriculture (D.P.A.) de Marrakech et le ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche Scientifique et de la Formation des cadres pour le soutien financier dans le cadre du projet de recherche (P.P.R).

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Karim FILALI MALTOUF, Professeur à l'université Mohammed V à rabat. Il m'a orientée afin d'effectuer les travaux de ma thèse et m'a acceptée au sein de son laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire et m'a orientée au Laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Ibn Sina pour finaliser les analyses microbiologiques. Je le remercie vivement d'avoir bien voulu juger ce travail et qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à Madame Bouchra BENZAOUZ, pour ses remarques et ses encouragements lors des comités de suivi de thèse.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance aux différents membres du jury, à Monsieur Jean-Luc COURTHAUDON de bien avoir accepté d'être président des membres du jury, à Madame Emira MEHINAGIC d'avoir bien voulu examiner ma thèse, à Madame Fatima LAMCHOURI et à Monsieur Didier HAUCHARD, pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier les rapporteurs de L'Université Sultan Moulay Slimane : Monsieur Hassan LATRACHE et Monsieur Aaziz OUATMANE d'avoir bien accepté d'examiner la thèse.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à l'ensemble du personnel du Laboratoire GRAPPE, en particulier : Dominique LE MEURLAY, Laurence BEAUCHET et Sophie pour leur soutien et leur aide.

Je remercie également le personnel des Laboratoires Pédagogiques et de l'Initiative du Groupe E.S.A. : Sylvain CHATONNET et Christine GOYER pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

Je remercie également les étudiants IL4 et IL3 de l'option Transformation Des Fruits de l'E.S.A. qui ont grandement contribué à la réalisation de ce travail dans le cadre des projets que j'ai dirigés : Ariane AMELIN, Martin ANDRE, Thibault BERNE, Xavier BOUSSELIN, Simon DUBALLET, Grégoire MARTIN, Yseult BALTARDIVE, Claire BECHU, Marie LEVESQUE et Ana Laura BECERRIL.

L'amitié et la bonne humeur des doctorantes du Laboratoire des Bioprocédés et Biointerfaces de la F.S.T. de Béni Mellal m'ont aidée à mener à bien mes travaux, je tiens à remercier Ilham HMID, Hajar RIZKI, Meryem EL HARFI, Ghita FARAJ et Bahija MOUSTAQUIM.

Je remercie également les responsables et les techniciens du Centre Nationale de Recherche Scientifique et Technique (C.N.R .S.T.) de Rabat pour leur aide et pour les analyses effectuées au sein de leurs Laboratoires.

Enfin, j'exprime mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Activités de recherche

Articles acceptés dans des revues internationales à comité de lecture

- A. BOUTAKIOUT, D. ELOTHMANI, M. MAHROUZ, H. HANINE (2015). Effect of seasons on proximate composition of cladode juice of two species of *cactaceae*. *International Journal of Technology Enhancements And Emerging Engineering Research*, 1 (03), 1-8.
- A. BOUTAKIOUT, D. ELOTHMANI, M. MAHROUZ, I. HMID, H. HANINE (2015). Phytochemical constituents and in vitro radical scavenging activity of different cladodes juice of *cactacea* cultivars from different areas in Morocco. *International Journal of Technology Enhancements And Emerging Engineering Research*, 1 (03), 56-66.

Article soumis dans une revue internationale à comité de lecture

- A. BOUTAKIOUT, D. ELOTHMANI, H. HANINE, M. MAHROUZ, D. LE MEURLAY, E. MEHINAGIC (2015). Effects of different harvesting seasons on antioxidant activity and phenolic content of prickly pear cladode juice.

Conférences internationales à comité de lecture

- A. BOUTAKIOUT, D. ELOTHMANI, H. HANINE (2014). A new natural juice of prickly pear cladode. Therapeutic applications, the environment and sustainable development. *1st International Congress on Natural Substances & Modeling: Therapeutic Applications, Environmental & Sustainable Development*, Taza, Morocco. **(Communication orale)**.
- A. IKHELK, A. BOUTAKIOUT, C. GREMY-GROS, M. MAHROUZ, H. HANINE, D. ELOTHMANI (2014). La Figue de Barbarie : valorisation d'un produit de terroir issu d'une culture adaptée aux défis climatiques dans la région d'Ouled Dlim - Sud du Maroc. *3^{ème} Colloque International Eau-Climat, Hammamet*, Tunisie. **(Poster)**.
- A. BOUTAKIOUT, H. HANINE, D. ELOTHMANI, M. MAHROUZ, E. MEHINAGIC (2014). Activité antioxydante du jus de cladode du figuier de Barbarie (*Opuntia ficus-indica*, *Opuntia megacantha*) par les méthodes DPPH, ABTS et FRAP. *17th World Congress of Food Science and Technology & Expo*, Montréal, Canada. **(Poster)**.
- A. BOUTAKIOUT, H. HANINE, D. ELOTHMANI, D. LE MEURLAY, E. MEHINAGIC (2013). Polyphénols du jus de cladode du figuier de Barbarie (*Opuntia ficus-Indica*) et leurs activités antioxydantes par la méthode FRAP. *Second International Symposium on Analytical Chemistry for a Sustainable Development*, Marrakech, Morocco. **(Poster)**.

Résumé

Les orientations de la politique agricole marocaine, notamment le Plan Maroc Vert, encouragent la valorisation des zones arides et le développement de cultures qui s'adaptent au réchauffement climatique. Le figuier de Barbarie est une plante adaptée au climat aride et semi-aride, mais il reste encore sous-exploité au Maroc. Les cladodes du figuier de Barbarie sont largement consommées au Mexique et elles contiennent des composants bioactifs qui ont des effets bénéfiques pour la santé. Le jus extrait à partir des cladodes des deux espèces *Opuntia ficus-indica* (inermis) et *Opuntia megacantha* (épineuse) a fait l'objet de ce travail. Les cladodes ont été récoltées dans la région de Marrakech (commune rurale Ouled Dlim) au Maroc durant trois saisons entre 2013 et 2014 (printemps, été et hiver) afin d'évaluer l'effet de la période de récolte sur la composition physico-chimique et biochimique ainsi que sur les propriétés antioxydantes. Le rendement en jus des cladodes varie en fonction des saisons et des espèces (20,83 – 63,39 %). Les analyses physico-chimiques et biochimiques ont montré que le jus de cladode est riche en polyphénols ($456 \pm 8 - 543 \pm 1 \mu\text{g EGA/ mL}$), en acide ascorbique ($17,60 \pm 1,87 - 22,88 \pm 0,62 \text{ mg /100 mL}$) et en potassium ($44,23 - 409,35 \text{ mg /100 mL}$), mais pauvres en sucres ($0,66 \pm 0,01 - 1,45 \pm 0,03 \text{ g /100 mL}$). L'analyse HPLC des composés phénoliques a montré que le jus de cladode est riche en flavonols à savoir l'isoquercétine et l'hyperoside ($645,90 \mu\text{g/mL}$ et $164,50 \mu\text{g/mL}$ respectivement). L'activité antioxydante du jus de cladode a été mesurée avec le test FRAP ($1,74 \pm 0,07 - 3,33 \pm 0,02 \mu\text{mol ET/mL}$) et l'activité antiradicalaire a été réalisée avec le test DPPH ($1,78 \pm 0,03 - 4,10 \pm 0,02 \mu\text{mol ET/mL}$) et le test ABTS ($12,78 \pm 1,69 - 23,10 \pm 0,17 \mu\text{mol ET/mL}$). La corrélation entre les analyses a montré qu'il y avait une relation significative ($p < 0,05$) entre les méthodes d'analyses, les espèces et les saisons. Le jus de cladode extrait à partir de l'espèce épineuse (*Opuntia megacantha*) et la récolte effectuée au mois d'août nous ont donné les plus grandes valeurs en composants biochimiques et pour l'activité antioxydante. L'analyse quantitative du jus de cladode du mois de mars par HPLC-DAD a montré la présence d'une quantité importante de flavonoïdes essentiellement l'isoquercétine et l'hyperoside. Les résultats de cette étude ont montré la richesse du jus en nutriments et son potentiel antioxydant. Le jus de cladode peut être conservé durant 42 jours à 4 °C, après une pasteurisation à 95 °C pendant 3 min dans un bain-marie et un abaissement du pH à 3,5 avec de l'acide citrique. Le jus de cladode peut être valorisé sous forme de nectar, thé glacé ou boisson gazeuse, sans oublier une valorisation de ses coproduits (confiture, soupe, poudre, etc.).

Mots clés : Figuier de Barbarie ; jus de cladode ; *Opuntia ficus-indica* ; *Opuntia megacantha* ; composition ; activité antioxydante ; pasteurisation ; valorisation.

Abstract

The orientations of the Moroccan agricultural policy concerning the Green Morocco Plan, promote the development of the arid zones and the development of crops that adapt to global warming. The prickly pear cactus is a plant which is adapted to the arid climate and still untapped in Morocco. Prickly pear cladodes contain bioactive components that have beneficial health effects. The juice extracted from cladodes of both species *Opuntia ficus-indica* (spineless) and *Opuntia megacantha* (spiny) was the subject of this work. The cladodes were harvested in the region of Marrakech (Ouled Dlim) in Morocco for three seasons (spring, summer and winter) between 2013 and 2014 to assess the effect of harvest time on the physico-chemical and biochemical composition and antioxidant activity. The yield of cladode juice varies within the seasons and species (63,39 – 20,83 %). The physico-chemical and biochemical analyzes showed that cladode juice is rich in polyphenols ($543 \pm 1 - 456 \pm 8 \mu\text{g GAE/mL}$), in ascorbic acid ($17,60 \pm 1,87 - 22,88 \pm 0,62 \text{ mg/100 mL}$) and in potassium ($409,35 - 44,23 \text{ mg/100mL}$) but poor in sugar ($0,66 \pm 0,01 - 1,45 \pm 0,03 \text{ g/100 mL}$). HPLC analysis of phenolic compounds has shown that cladode juice is rich in flavonols namely isoquercetin and hyperoside ($645,90 \text{ mg/mL}$ and $164,50 \text{ mg/mL}$ respectively). The antioxidant activity of cladode juice was measured with FRAP test ($1,74 \pm 0,07 - 3,33 \pm 0,02 \mu\text{mol TE/mL}$) and the antiradical activity was carried out with the DPPH test ($1,78 \pm 0,03 - 4,10 \pm 0,02 \mu\text{mol TE/mL}$) and the ABTS test ($12,78 \pm 1,69 - 23,10 \pm 0,17 \mu\text{mol TE/mL}$). The correlation analysis indicated that there was a significant relationship ($p < 0,05$) between the methods of analysis, species and seasons. Cladode juice extracted from the spiny species and in August gave us the highest values. Quantitative analysis of cladode juice harvested in March by HPLC-DAD showed the presence of a significant quantity of flavonoids essentially isoquercetin and hyperoside. Results of these analyzes showed that cladode juice is rich in nutriment and has an antioxidant activity potential. The juice can be stored for 42 days at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, after pasteurization at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 min in a water bath and lowering the pH to 3,5 with citric acid. Cladode juice can be used as nectar, iced tea or soft drink and with a valorization of its coproducts (jam, soup, powder etc.).

Keywords: prickly pear cactus; cladode juice; *Opuntia ficus-indica*; *Opuntia megacantha*; composition; antioxidant activity; pasteurization; valorization.

ملخص

توجهات السياسة الزراعية المغربية، بما في ذلك برنامج المغرب الأخضر، تشجع على منح قيمة للمناطق القاحلة و تنمية الزراعات التي تتكيف مع ظاهرة الاحتباس الحراري. التين الشوكي هو نبات يتكيف مع المناخ الجاف و لكن يظل غير مستغل في المغرب، مضارب التين الشوكي تحتوي على مكونات بيولوجية نشيطة لها منافع صحية مفيدة. العصير المستخرج من مضارب التين الشوكي لكلا النوعين: الشوكي و غير الشوكي كان موضوع هذا البحث. تم تجميع المضارب في منطقة مراكش بالجماعة القروية أولاد الدليم في المغرب لمدة ثلاث فصول (ربيع، صيف، و شتاء) لدراسة تأثير الفصول على المكونات الكيميائية و البيوكيميائية و كذلك خصائص مضادات الأكسدة. إنتاج عصير المضارب يختلف حسب الفصول و الأنواع (20,83 - 63,39%). التحليلات الكيميائية أظهرت أن عصير المضارب غني بمادة البوليفينول، حمض الأسكوربيك، البوتاسيوم و لكنه فقير في السكر. التحليلات الخاصة بمكونات البوليفينول بطريقة (HPLC) أظهرت ان العصير غني بالفلافونول. النشاط المضاد للأكسدة قيم على العصير بثلاث طرق : (DPPH)، (FRAP)، (ABTS). أظهرت الدراسة الإحصائية ان هناك علاقة دلالة احصائية ($P < 0,05$) بين طرق التحليل، الأنواع و الفصول. العصير المستخرج من النوع الشوكي و خاصة في فصل الصيف أعطانا أكبر مردودية من حيث المكونات و النشاط المضاد للأكسدة. يمكن لعصير التين الشوكي تخزينه لمدة 42 يوما في درجة حرارة 4 درجة مئوية و ذلك بعد البسترة في درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة ثلاث دقائق في حمام مائي و خفض درجة الحموضة الى 3,5 بحمض لستريك.

كلمات البحث :

مضارب التين الشوكي، عصير، مكونات، نشاط مضاد للأكسدة، بسترة

Table des matières

Dédicaces.....	1
Remerciements.....	2
Activités de recherche	4
Résumé.....	5
Abstract.....	6
ملخص	7
Liste des abréviations.....	12
Table des illustrations.....	13
Table des tableaux	15
INTRODUCTION GENERALE	16
1^{ERE} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
Chapitre 1. Généralités sur le figuier de Barbarie	22
1. Introduction	22
2. Cactées.....	23
2.1. Définition.....	23
2.2. Origine et diffusion.....	23
2.3. Morphologie	25
2.4. Classification.....	26
3. Fiquier de Barbarie.....	27
3.1. Définition.....	27
3.2. Distribution.....	27
3.3. Taxonomie	28
3.4. Description morphologique	29
3.5. Physiologie.....	30
3.6. Habitat	31
3.7. Reproduction et techniques de multiplications.....	32
3.8. Exigences écologiques	33
3.9. Répartition géographique.....	35
3.10. Espèces et cultivars	36
3.11. Utilisations	36
4. Cladodes du figuier de Barbarie	41
4.1. Morphologie	41
4.2. Composition chimique.....	42
4.3. Applications pharmaceutiques et cosmétiques	49
Chapitre 2. Propriétés antioxydantes	50
1. Radicaux libres et stress oxydatif.....	50
1.1. Radicaux libres	50
1.2. Moyens de défense contre les radicaux libres	52
2. Antioxydants.....	54
2.1. Antioxydants enzymatiques	54
2.2. Antioxydants non-enzymatiques.....	54
3. Mécanismes de réactions de l'activité antioxydante in vitro.....	58
3.1. Réactions de transfert de proton d'hydrogène	58
3.2. Réactions de transfert d'électrons.....	59
Chapitre 3. Polyphénols.....	60

1. Généralités	60
2. Structure et classification	61
2.1. Flavonoïdes	61
2.2. Acides phénoliques et tanins hydrolysables	65
2.3. Stilbènes	67
2.4. Lignines et subérines	68
3. Voies de biosynthèse des polyphénols	68
4. Propriétés des polyphénols	70
4.1. Propriétés gustatives	70
4.2. Propriétés antioxydantes	70
4.3. Propriétés antifongiques et antibactériennes	72
4.4. Impact sur la santé.....	72
4.5. Applications industrielles.....	73
Chapitre 4. Production industrielle des jus	74
1. Définition	74
2. Extraction	76
3. Traitement thermique	78
3.1. Généralités.....	78
3.2. Pasteurisation	80
4. Conditionnement	81
Conclusion	82
2^{EME} PARTIE : MATERIEL ET METHODES	83
Chapitre 1. Matériel végétal	84
1. Zone d'échantillonnage	84
2. Conditions climatiques	85
3. Types de sols	86
4. Echantillonnage	86
Chapitre 2 : Extraction du jus	88
Chapitre 3. Analyses physico-chimiques et biochimiques	88
1. Analyses physico-chimiques de base	88
1.1. Teneur en eau.....	88
1.2. Teneur en cendre.....	88
1.3. pH	88
1.4. Acidité titrable	89
1.5. Degrés brix.....	89
2. Analyses physico-chimiques et biochimiques	89
2.1. Polyphénols totaux.....	89
2.2. Protéines totaux.....	90
2.3. Tanins condensés.....	92
2.4. Tanins hydrosolubles	92
2.5. Flavonoïdes	93
2.6. Sucres.....	94
2.7. Dosage des pectines	94
2.8. Acide ascorbique	95
2.9. Minéraux	95
3. Identification des acides organiques par HPLC / MS	95

4.	Identification des polyphénols par HPLC	96
5.	Activité antioxydante et antiradicalaire in vitro	96
5.1.	Piégeage des radicaux libres par le test DPPH	96
5.2.	Piégeage des radicaux libres par le test ABTS	100
5.3.	Activité antioxydante par le test FRAP	102
	Chapitre 4. Analyses microbiologiques	104
1.	Flore totale	105
2.	Coliformes totaux et fécaux	106
3.	Levures et moisissures	107
4.	Salmonelles	107
	Chapitre 5. Pasteurisation	108
1.	Principe	108
2.	Mode opératoire	110
	3^{EME} PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	113
	Chapitre 1. Rendement, analyses physico-chimiques et biochimiques	114
1.	Rendement	114
2.	Analyses physico-chimiques de base	115
3.	Analyses biochimiques	117
4.	Analyse des acides organiques avec HPLC/MS	121
5.	Analyse des composés phénoliques avec HPLC-DAD	122
	Chapitre 2. Activité antioxydante et antiradicalaire	127
	Chapitre 3. Pasteurisation	137
1.	Analyses microbiologiques	137
2.	Analyses chimiques	138
3.	Analyse des surfaces de réponse	139
4.	Paramètres de pasteurisation	143
5.	Temps de stockage	144
6.	Effet de la température sur les composants	148
6.1.	Cinétiques de réactions	148
6.2.	Analyse des cinétiques de réactions	153
	4^{EME} PARTIE : Etude préliminaire de valorisation du jus et de ses coproduits	155
1.	Jus	156
1.1.	Nectar	156
1.2.	Boisson gazeuse	156
1.3.	Thé glacé	156
1.4.	Kéfir	157
2.	Tests de dégustation	157
3.	Coproduits	161
3.1.	Cuisson	161
3.2.	Chips	162
3.3.	Farine	162
3.4.	Confiture	162
3.5.	Soupe	163
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	164

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	169
<u>ANNEXES : PUBLICATIONS ET CHROMATOGRAMMES</u>	186

Liste des abréviations

ABTS	: 2,2-azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).
CAM	: Crassulacean Acid Metabolism.
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
EA	: Efficacité Antiradicalaire.
EAC	: Equivalent Acide Citrique.
EAG	: Equivalent Acide Gallique.
EAT	: Equivalent Acide Tannique.
EG	: Equivalent Glucose.
ERO	: Espèces Réactives de l'Oxygène.
ET	: Equivalent Trolox.
ESAB	: Equivalent Serum Albumin Bovine.
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power.
HP	: High Pressure.
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography.
PEF	: Pulsed Electric Fields.
PME	: Pectine Méthyl-Estérase.
POD	: Peroxydase.
rpm	: rotation par minute.
tr	: tour.
UFC	: Unité Formant Colonies.

Table des illustrations

Figure 1 : Deux espèces du figuier de Barbarie appartenant au genre <i>Opunita</i>	22
Figure 2 : Carte illustrant l'aire de distribution du cactus à son origine	24
Figure 3 : Schéma illustrant quelques organes du cactus.	26
Figure 4: Schéma illustrant les différentes parties du figuier de Barbarie	30
Figure 5: Photosynthèse de type CAM.	31
Figure 6: Schéma illustrant la technique de bouturage.....	33
Figure 7 : Morphologie des cladodes du figuier de Barbarie.	42
Figure 8 : Schéma illustrant les molécules intervenant dans les protections cellulaires ..	53
Figure 9 : Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux.	55
Figure 10 : Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols	56
Figure 11 : Exemple de carotène et de xanthophylle.....	57
Figure 12 : Structure chimique de la 2- phénylbenzopyrane.....	57
Figure 13 : Mécanismes d'actions antioxydantes des composés phénoliques	58
Figure 14 : Différentes familles de polyphénols	61
Figure 15 : Structures de base des flavonoïdes	62
Figure 16 : Structures chimiques des flavonols.	62
Figure 17 : Structures chimiques des différents flavones et flavonoïdes.	63
Figure 18 : Structures chimiques des catéchines.	64
Figure 19 : Structures chimiques de quelques phénylchalcones.	64
Figure 20 : Structures chimiques de quelques dihydrochalcones.....	65
Figure 21 : Structures chimiques de quelques anthocyanidines.....	65
Figure 22 : Structures chimiques de quelques acides hydroxybenzoïques	66
Figure 23 : Structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques (C6-C3).	66
Figure 24 : Structure chimique d'un gallotannin.....	67
Figure 25 : Structures de base des stilbènes hydroxylés.	68
Figure 26 : Voies simplifiées de la synthèse des polyphénols.....	69
Figure 27 : Structure chimique d'un anion phénoxyde.....	70
Figure 28 : Réactions potentielles du DPPH avec l'eugénol.....	71
Figure 29 : Mécanisme de la régénération d'un ortho-diphénol.....	72
Figure 30 : Pressoir à paquet	77
Figure 31 : Principe de fonctionnement d'un pressoir à corbeil.	77
Figure 32 : Schéma explicatif du fonctionnement d'un pressoir à bande.....	78
Figure 33 : Localisation du centre d'Ouled Dlim dans la carte du Maroc.....	84
Figure 34: Photo satellite de la zone d'échantillonnage.....	85
Figure 35: Moyenne annuelle de la pluviométrie et de la température de la région d'Ouled Dlim.	85
Figure 36 : Photos des deux espèces étudiées et prélevées dans la commune rurale d'Ouled Dlim	86
Figure 37 : Dimensionnement des cladodes.....	87
Figure 38 : Cladodes des deux espèces du figuier de Barbarie	87
Figure 39: Etapes de l'extraction du jus à partir des cladodes des deux espèces.....	88
Figure 40 : Structure chimique du radical libre DPPH•	97
Figure 41 : Structure chimique du non radical DPPHH.....	98

Figure 42 : Structure de l'ABTS ^{•+}	100
Figure 43 : Réaction FRAP entre Fe ³⁺ -TPTZ et l'antioxydant	102
Figure 44 : Processus thermique des jus	109
Figure 45 : Chromatogrammes HPLC-DAD du jus de cladode d' <i>Opuntia ficus-indica</i> ..	125
Figure 46 : Activité antioxydante et antiradicalaire des deux espèces.....	128
Figure 47 : Droites de régression du Trolox.....	129
Figure 48: Cinétique de réaction de l'activité antioxydante du jus de cladode.....	130
Figure 49 : Efficacité de dix fractions purifiées de procyanidines de chocolat et de douze antioxydants commerciaux.	134
Figure 50 : Surfaces de réponse en 3D en fonction du temps et de la température.....	142
Figure 51 : Effet du stockage sur l'activité antioxydante durant le temps.	144
Figure 52 : Effet du stockage sur la teneur en polyphénols à différentes températures.	145
Figure 53 Effet du stockage sur l'indice de brunissement à différentes températures...	146
Figure 54 : Effet de la température sur la teneur en polyphénols durant le temps.....	149
Figure 55 : Effet de la température sur l'activité antioxydante par le test DPPH.....	151
Figure 56 : Effet de la température sur l'indice de brunissement.....	152
Figure 57 : Régression linéaire.....	154
Figure 58 : Graphique à secteur de l'appréciation du kéfir	159
Figure 59 : Graphique à secteur de l'appréciation du nectar	160
Figure 60 : Graphique à secteur de l'appréciation du thé glacé.....	160
Figure 61 : Graphique à secteur de l'appréciation de la boisson gazeuse	161
Figure 62 : Farine obtenue à partir de la purée des coproduits des cladodes	162
Figure 63 : Confiture obtenue à partir des coproduits des cladodes.....	163

Table des tableaux

Tableau 1: Principaux composants des cladodes du figuier de Barbarie	42
Tableau 2 : Composition en monosaccharides non cellulosiques des cladodes	44
Tableau 3 : Composition des cladodes en acides organiques.....	44
Tableau 4: La composition en acides aminés dans les cladodes du figuier de Barbarie .	45
Tableau 5: La composition en acides aminés dans les cladodes du figuier de Barbarie .	46
Tableau 6 : Composition en vitamines dans les cladodes du figuier de Barbarie.....	47
Tableau 7 : Composition en polyphénols des cladodes de <i>l'Opuntia ficus-indica</i>	48
Tableau 8 : Différents types de sols de la région d'Ouled Dlim	86
Tableau 9 : Valeurs maximales tolérées pour les jus non pasteurisés et pasteurisés. ...	105
Tableau 10 : Niveaux des facteurs du plan composite centré	110
Tableau 11 : Matrice expérimentale	111
Tableau 12 : Plan expérimental	112
Tableau 13 : Dimensions des cladodes des deux espèces	114
Tableau 14 : Rendement en jus des cladodes des deux espèces.....	115
Tableau 15 : Analyses physico-chimiques de base du jus de cladode des deux espèces	116
Tableau 16 : Analyses biochimiques du jus de cladode des deux espèces	118
Tableau 17 : Teneur en minéraux du jus de cladode des deux espèces.....	120
Tableau 18 : Composés phénoliques du jus de cladode d' <i>Opuntia ficus-indica</i> et <i>Opuntia megacantha</i> récoltée au mois de mars.....	122
Tableau 19 : Activité antioxydante et antiradicalaire des deux espèces <i>Opuntia ficus- indica</i> et <i>Opuntia megacantha</i>	127
Tableau 20 : Essais microbiologiques sur le jus de cladode	137
Tableau 21 : Résultats des analyses chimiques selon le plan d'expérience.	139
Tableau 22 : Analyse de la variance (ANOVA) des surfaces de réponse.....	141
Tableau 23 : Réponses du test par paire réalisé sur le nectar.....	157
Tableau 24 : Réponse du test triangulaire sur le thé glacé.....	158
Tableau 25 : Résultats du test évaluant l'appréciation des produits	159

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'agriculture joue un rôle important dans l'économie nationale du Maroc et les cultures pluviales occupent une part importante de la surface agricole utile (90%). L'agriculture des zones arides est basée essentiellement sur des espèces qui résistent à la sécheresse, notamment le cactus. C'est une plante qui a l'aptitude de vivre avec une faible quantité d'eau et de supporter une longue période de sécheresse (Arba, 2009).

Les terres arides au Maroc s'étendent sur une superficie dépassant 33 millions d'hectares. La pluviométrie saisonnière et annuelle de ces zones arides est fortement variable avec des coefficients de variation de la pluviométrie annuelle de 25 à 100% selon l'endroit. Ce sont surtout les précipitations printanières qui ont diminué (-40%), et les températures moyennes ont augmenté de 0,16 °C par décennie depuis les années soixante (Mahyou et *al.*, 2010). Les tendances futures montrent, en général, une baisse des précipitations et une augmentation des températures au niveau national. La pluviométrie annuelle baissera de l'ordre de 20% d'ici 2050 et de 40% à l'horizon 2080. Cette chute affectera surtout les saisons pluvieuses notamment, l'automne et le printemps. Le réchauffement avoisinera 3 °C d'ici 2080 et atteindra même 5 °C dans certaines zones pastorales. Cet accroissement entraînera une augmentation de l'évapotranspiration de l'ordre de 20% d'ici 2050 et de 40% à l'horizon 2080. De même, il est tout à fait possible que les événements extrêmes, tels que les sécheresses prolongées et les pluies intensives, deviennent fréquents dans les terres arides. Ces tendances futures, conjuguées aux impacts déjà existants, vont entraîner une perte de la biodiversité des terres arides et augmenter leur vulnérabilité à la désertification (Gommes et *al.*, 2009).

Le cactus est une espèce adéquate pour une agriculture durable au Maroc grâce à sa résistance à la sécheresse, la lutte contre la désertification et à son utilisation dans l'alimentation de l'Homme et du bétail. C'est une plante qui est économiquement importante, mais qui reste très peu exploitée. Elle peut être valorisée en produits agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques ; ce sont des produits à haute valeur ajoutée pour les agriculteurs et les populations locales. Ces produits vont jouer un rôle socio-économique important pour les agriculteurs et les populations rurales et vont contribuer au développement durable en milieu rural (Arba, 2009).

L'agriculture au Maroc a toujours été un secteur stratégique pour le développement socio-économique du pays. Depuis l'indépendance, le secteur agricole a connu de nombreux programmes de développement agricole et rural et de réformes structurelles pour permettre au pays d'assurer sa sécurité alimentaire et de contribuer à la croissance économique du pays. Dans ce cadre, le Plan Maroc Vert est un programme de

développement régional par excellence, qui cherche la mise en valeur de l'ensemble du potentiel agricole territorial. Le Plan Maroc Vert vise à développer une approche orientée vers la lutte contre la pauvreté, en augmentant de manière significative le revenu agricole des exploitants les plus fragiles, notamment dans les zones périphériques. Cela aura un impact considérable sur la croissance, la mise à niveau et l'augmentation du revenu agricole comme moteur de lutte contre la pauvreté rurale, justifiant ainsi la mise en œuvre d'importants moyens financiers et institutionnels. Le cactus avec l'arganier est la clé fondamentale de la réussite de l'un des piliers principaux du Plan Maroc Vert qui concerne l'adaptation au changement climatique au niveau local au profit des petits agriculteurs des zones moins favorables (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime du Maroc, 2010).

La demande en consommation des produits du terroir est croissante sur les marchés nationaux et internationaux, ce qui offre d'importantes opportunités pour leur commercialisation. L'importance économique de la culture du figuier de Barbarie dont la superficie s'étend de 120.000 à 150.000 ha (Rhamna, Sidi Ifni, Aït Ba Aamrane, Al-Hoceima, Doukala, Oued-Zem et les environs de Casablanca) réside actuellement dans la commercialisation de ses fruits et dans ses ressources fourragères pour l'alimentation du bétail (Arba, 2009). Les autres utilisations du figuier de Barbarie (confiture, fruit confit ou séché, poudre de cladode, ...) restent encore au stade des coopératives ou des petites et moyennes entreprises. Les cladodes du figuier de Barbarie restent encore sous-exploités au Maroc, une valorisation est alors nécessaire vu les innombrables vertus qui ont été démontrées dans plusieurs études, ainsi, les industriels marocains devraient se pencher sur cet axe afin de développer ce secteur qui s'avère très promoteur.

Afin de mettre en valeur le figuier de Barbarie, nous nous sommes orientés vers les cladodes qui sont encore mal connus par le grand public, mais largement consommés au Mexique comme légume. Les études réalisées sur les cladodes sont nombreuses par contre le jus de cladode n'a pas encore été étudié. De ce fait, une étude a été initiée sur le jus de cladode du figuier de Barbarie marocain ainsi qu'une valorisation industrielle à son utilisation. Cela constituera une solide base scientifique aux industriels qui veulent investir dans ce domaine et fera l'objet de création d'entreprises et d'emplois.

Nous avons effectué des analyses et des approches qui vont aider à ouvrir un nouveau volet sur l'exploitation du figuier de Barbarie, à savoir, le développement d'un nouveau

produit « jus de cladode », sa caractérisation physico-chimique, biochimique et étude de sa stabilité. Ce présent travail est composé de quatre grandes parties :

- La première partie traite l'analyse physico-chimique et biochimique du jus de cladode des deux espèces présentes au Maroc : *Opuntia ficus-indica* (inermis) et *Opuntia megacantha* (épineuse). Elle a pour but de recueillir toutes les données nécessaires concernant la composition du jus des deux espèces. Les dimensions des cladodes sont importantes dans cette étude, elles ont été choisies selon des mesures bien définies et récoltées durant trois saisons (printemps, été et hiver) dans la commune rurale d'Ouled Dlim située au Nord-Ouest de la ville de Marrakech au Maroc. Une analyse primaire du jus a été effectuée sur les deux espèces durant les trois saisons à savoir : rendement en jus, teneur en eau, teneur en cendre, pH, degrés Brix et acidité titrable. Ensuite, les biomolécules importantes du jus ont été quantifiées : polyphénols, flavonoïdes, sucres, pectines, protéines, tannins, acide ascorbique et minéraux (sodium, magnésium, calcium et potassium). Une analyse HPLC a été réalisée afin de déterminer et quantifier une gamme importante de polyphénols présents dans le jus et une analyse qualitative des acides organiques.

- La deuxième partie concerne une valorisation majeure du jus de cladode des deux espèces et qui est l'analyse de l'activité antioxydante et antiradicalaire in vitro. Les radicaux libres causent des dommages aux composants des cellules (ADN, protéines, lipides, membranes et acides nucléiques), ainsi, les antioxydants naturels du jus piègent ces radicaux libres et protègent le corps de plusieurs maladies (maladies cardiovasculaires, diabète et cancer). Afin d'évaluer cette activité, trois méthodes d'analyse les plus utilisées ont été effectuées sur le jus de cladode des deux espèces durant les trois saisons : DPPH, FRAP et ABTS.

- La troisième partie porte sur la stabilité du jus de cladode (microbiologique, nutritive et temps de stockage). Ainsi, une pasteurisation a été effectuée selon des températures et des temps différents et avec une modification du pH par l'acide citrique. Un plan d'expérience a été réalisé afin de déterminer les conditions expérimentales de la pasteurisation et son effet sur la teneur en polyphénols, en flavonoïdes et sur l'activité antioxydante. L'effet du temps de stockage sur la teneur en polyphénols, sur l'activité antioxydante et sur le brunissement a été réalisé sur une période de 6 semaines.

- La quatrième partie vise à donner une valorisation commerciale et industrielle du jus. Une gamme de jus a été réalisée afin d'élargir ses domaines d'utilisation : nectar,

boisson gazeuse, thé glacé et Kéfir. Les coproduits induits ont été à leur tour valorisés (confiture, soupe, poudre, ships) afin d'exploiter la cladode en entier.

1^{ERE} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Généralités sur le figuier de Barbarie

1. Introduction

Le figuier de Barbarie est une plante grasse appartenant à la famille des cactées et plus précisément au genre *Opuntia*. Il est cultivé dans les climats arides, comme dans les régions méditerranéennes et d'Amérique centrale (Ginestra et *al.*, 2009). Les régions semi-arides du Mexique renferment la plus grande diversité de cactus dans le monde (Pimienta-Barrios, 1994). Le genre *Opuntia* contient environ 300 espèces et beaucoup d'entre elles produisent des tiges et des fruits bien tendres et comestibles (Hegwood, 1994). Parmi ces espèces on cite *Opuntia ficus-indica* (inermes ou sans épines) et *Opuntia megacantha* (épineuse) largement connues sous le nom de figuier de Barbarie et qui ont fait l'objet de notre étude (fig.1).

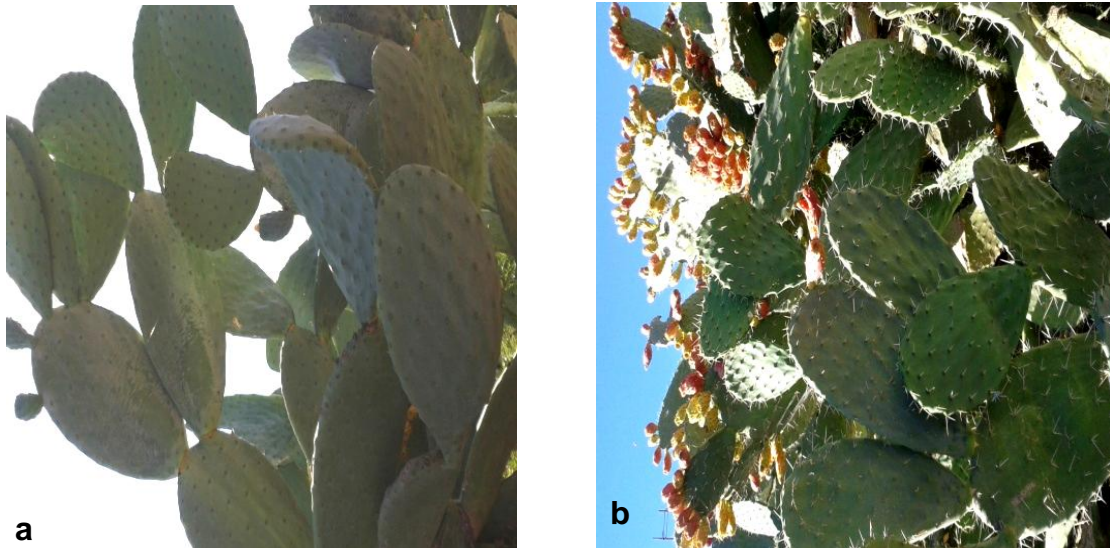


Figure 1 : Deux espèces du figuier de Barbarie appartenant au genre *Opuntia*, (a) : *Opuntia ficus indica* (inermes), *Opuntia megacantha* (épineuse).

La jeune partie de la tige du cactus, ou cladode, est souvent consommée comme un légume dans les salades, tandis que le fruit est consommé en frais (Ávila-Curiel et *al.*, 2003). La composition chimique des cladodes dépend de la variété, du stade de croissance et des conditions environnementales. Elles ont une valeur nutritive élevée, principalement en raison de leurs ressources minérales, en protéines, en fibres alimentaires et en contenu phytochimiques (Bensadon et *al.*, 2010). On les utilise à des fins médicinales et cosmétiques, comme fourrage ou matériaux de construction et en tant

que source de couleurs naturelles. Cependant, leurs utilisations sont encore essentiellement limitées aux pays d'origine (Stintzing and Carle, 2005).

2. Cactées

2.1. Définition

La famille des cactées appartient aux plantes grasses. Elles ont la capacité de survivre sur leurs réserves durant une période de sécheresse temporaire grâce à un système de stockage de l'eau. Dans une situation similaire, la plupart des autres plantes dépériraient et mourraient par manque d'eau (Mace, 2003).

Leur aspect souvent étrange est lié aux mutations qu'elles ont mises au point pour stocker l'eau dans leurs tiges, leurs feuilles ou leurs racines qui sont très charnues. D'autres évolutions plus importantes ont permis d'augmenter les réserves d'eau en réduisant l'évaporation. Elles présentent souvent un épiderme soit charnu, soit couvert de poils ou d'une couche cireuse qui réduit l'évaporation. Le revêtement dense en épines joue un rôle décisif et limite les effets de la chaleur solaire intense en fournissant une ombre partielle à la plante. Les cellules de ces plantes supportent de grandes variations de leur teneur en eau que les autres plantes « normales » (Mace, 2003).

Il existe des mythes très anciens concernant les cactées. Le cactus était un symbole important à la fois chez les Aztèques au Mexique et chez les Incas au Pérou, et l'on retrouve des illustrations de ses vertus curatives et divinatoires sur de nombreux bâtiments, poteries et autres objets usuels (Mace, 2003).

2.2. Origine et diffusion

Les cactus sont presque tous originaires du Nouveau Monde, certaines espèces allant jusqu'au Nord de l'Alberta au Canada, d'autres poussant une pointe au Sud jusqu'en Patagonie (fig.2). Les seules exceptions sont quelques espèces présentes en Afrique orientale et à Madagascar où il se peut qu'elles aient été apportées par des oiseaux migrants et qu'elles y aient continué leur évolution (Mace, 2003).



Figure 2 : Carte illustrant l'aire de distribution du cactus à son origine (Lamb, 1991).

La culture du cactus est originaire des plateaux du Mexique qui sont caractérisés par un climat chaud et sec. L'utilisation alimentaire de l'espèce date de l'époque préhistorique grâce à la découverte de graines fossiles datant du septième millénaire av. J.-C. (Mullas et al., 2004).

Ces régions semi-arides du Mexique présentent une grande diversité génétique de variétés cultivées et variétés sauvages du cactus. Plusieurs espèces ont été introduites dans d'autres régions du monde ayant un climat semi-aride, telles que l'Australie, l'Afrique du Sud, le Madagascar ou la région méditerranéenne. Le cactus a été introduit en Europe méditerranéenne vers la fin du 15^{ème} et le début du 16^{ème} siècle pour l'alimentation des populations indigènes. Il a été aussi introduit, au 16^{ème} siècle, au Nord et au Sud de l'Afrique et tout au long du bassin méditerranéen. Actuellement, il est cultivé dans les régions arides et semi-arides de plusieurs pays. Le cactus, comme culture, était inconnu en Europe avant les voyages de Christophe Colomb. Il fut décrit de façon précise pour la première fois en 1535 par l'espagnol Gonzalo Fernandez de Oviedo y Valdés dans son histoire des Indes occidentales. Sa morphologie insolite marqua les esprits des premiers conquistadors. Outre les fruits, c'est l'élevage de la cochenille qui attira surtout leur attention ; mais l'élevage de cette dernière aux îles Canaries ne fut réussi qu'au 19^{ème} siècle. Son fruit constituait depuis longtemps un aliment important

dans le régime alimentaire des Indiens (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime du Maroc, 2010).

Le genre *Opuntia* a été utilisé au Mexique depuis l'époque préhispanique, en association avec le maïs et l'agave, constituant ensemble la pièce maitresse de l'économie agricole de la civilisation aztèque. Au cours des dernières années il y'a eu un intérêt accru pour diverses espèces d'*Opuntia*, en raison du rôle qu'elles sont supposées jouer dans le succès des systèmes d'agriculture durable dans les zones marginales ; notamment les zones arides et semi- arides (FAO, 2003).

2.3. Morphologie

Les cactées ont des formes diverses, allant de plantes miniatures jusqu'à de grands arbres atteignant près de 25 m de hauteur. Cependant à l'exception du genre *Preskia* et des genres proches qui ont des feuilles normales, des aiguillons et une structure un peu élémentaire pour les fleurs et les fruits, tous les autres genres sont très similaires. Ces autres genres sont pratiquement dépourvus de feuilles, les processus de photosynthèse se produisant en revanche dans des tiges vertes charnues (Lamb, 1991).

C'est au niveau des aréoles qu'apparaissent les aiguillons, les nouveaux rameaux et les fleurs. Il y'a des exceptions telles que les *Echinocereus* dont les boutons floraux percent la paroi de la tige près d'une aréole, les *Mammillaria* et les *Corphanta* chez qui les boutons sortent d'un emplacement axillaire entre les tubercules ou d'une gorge partant de l'aréole du tubercule. Les fleurs des cactus sont sessiles, la seule exception étant fournie par les *Pereskias* à fleurs pédonculées (fig.3). Les fruits sont habituellement des baies juteuses, mais dans quelques genres, il s'agit de capsules sèches d'où les graines s'échappent soit par un pore basal ou par une fente irrégulière (Lamb, 1991).

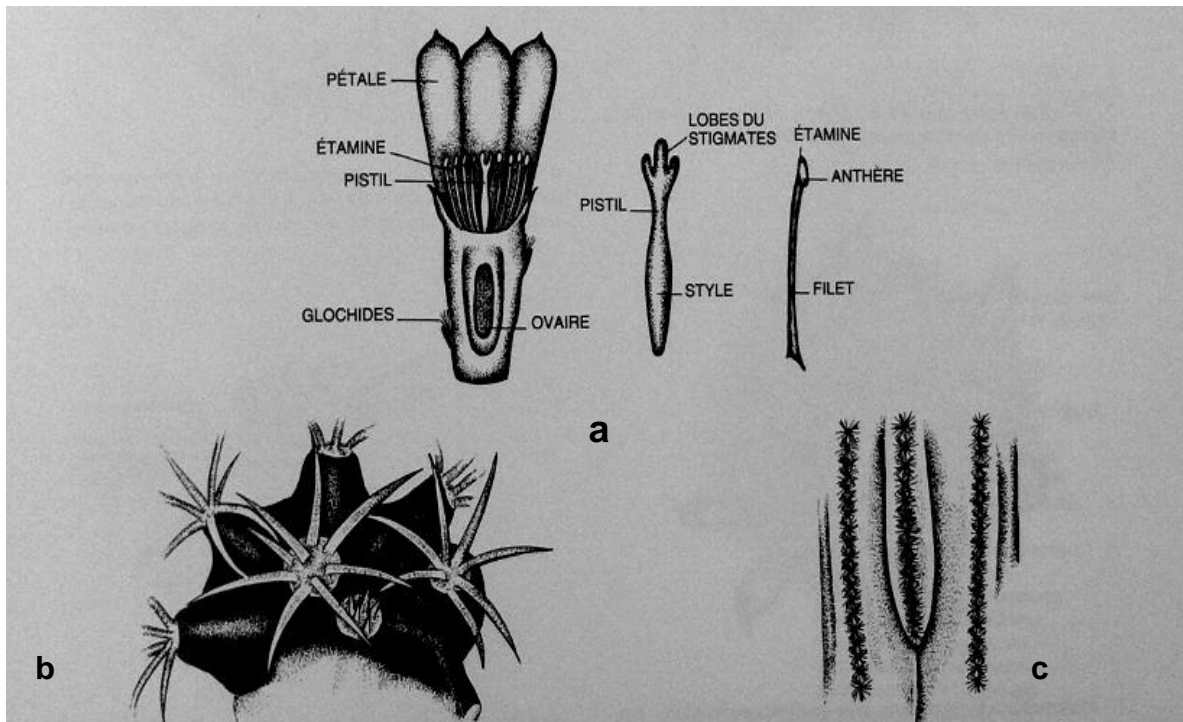


Figure 3 : Schéma illustrant quelques organes du cactus, (a) : fleur de cactus d'après l'exemple d'*Opuntia*, (b) : jeune plante montrant sa structure tuberculée, qui en approchant de la maturité, deviendra une formation à côte, (c) : coupe d'une tige de *Carnegiea gigantea* montrant la structure côtelée et la façon dont une autre côte se forme au fur et à mesure du développement de la tige (Lamb, 1991).

2.4. Classification

La famille des cactacées est subdivisée en huit groupes, dont chacun d'entre eux comprend plusieurs genres (Lamb, 1991) :

- **Groupe *Pereskia*** : Plante à feuilles, mais sans glochides. Les graines noires sont sans arilles (enveloppe extérieure ou appendice fixé au pédoncule de l'ovule).
Genres : *Maihuenia*, *Pereskia*.
- **Groupe *Opuntia*** : Plantes à petites ou minuscules feuilles et glochides. Les graines sont ailées ou munies d'un arille.
Genres : *Opuntia*, *Pereskiopsis*, *Pterocactus*, *Quiabentia*, *Tacinga*.
- **Groupe *Cereus*** : Plantes sans feuilles ni glochides, à graines noires ou brunes. Ces plantes sont ordinairement colonnaires, côtelées et généralement pourvues de nombreux aiguillons. L'extérieur de la base du tube floral est nu ou épineux.
Genres : *Armatocereus*, *Arrojadoa*, *Jasminocereus*, *Monvillea*, *Wilcoxia* etc.

- **Groupe *Echinopsis*** : Comme le groupe *Cereus*, sauf que les plantes peuvent être naines et que l'extérieur du tube floral est généralement pourvu de poils ou peut posséder des écailles étroites.
Genre: *Acanthocalycium*, *Arequipa*, *Espostoa*, *Mila*, *Oroya*, *Weingartia* etc.
- **Groupe *Hylocereus***: Comme le groupe *Cereus*, mais les plantes sont épiphytes, souvent à racines aériennes, et côtelées. Les aiguillons sont souvent assez peu nombreux ou complètement absents.
Genres : *Aporocactus*, *Cryptocactus*, *Hylocereus*, *Rhipsalis*, *Wittia* etc.
- **Groupe *Neoporteria*** : Plantes généralement naines, globuleuse à courtes, cylindriques et côtelées. La base du tube floral est un peu laineuse, avec des aiguillons dans le haut.
Genres : *Austrocactus*, *Frailea*, *Nonocactus*, *Parodia*, *Wigginsia*, etc.
- **Groupe *Melocactus*** : Comme le groupe *Neoporteria*, la base du tube floral est nue ou laineuse, mais sans aiguillons. Les fleurs sont portées sur un cephalium terminal, sauf chez les *Buiningia* où il est latéral.
Genre : *Buiningia*, *Discocactus*, *Melocactus*.
- **Groupe *Echinocactus*** : Comme le groupe *Melocactus*, sauf que les fleurs apparaissent au centre, mais sans cephalium.
Genre : *Ariocarpus*, *Aztekium*, *Islaya*, *Solisia*, *Strombocactus*, *Toumeyia*, etc.

3. Figuier de Barbarie

3.1. Définition

Le figuier de Barbarie est originaire du Mexique, il est bien adapté aux zones arides et semi-arides (Reynolds et *al.*, 2003). Il occupe une partie importante dans l'alimentation humaine et il est également utilisé comme fourrage pour le bétail. C'est une plante intéressante en raison des conditions environnementales dans lesquelles elle se développe et sa résistance aux conditions climatiques extrêmes (Hernández-Urbiola et *al.*, 2011).

3.2. Distribution

Le figuier de Barbarie fut introduit en Afrique du Nord (Algérie, Tunisie, Maroc) vers le 16^{ème} siècle. Sa culture s'est diffusée rapidement dans le bassin de la Méditerranée. Elle s'est également répandue dans l'hémisphère sud, notamment en Afrique du Sud, à Madagascar, à la Réunion, à l'île Maurice, en Inde, à Ceylan et en Australie. On peut

également la trouver au Canada, en Argentine et au Pérou à une altitude pouvant atteindre 5100 m. Il est actuellement introduit dans plus de 30 pays où il est cultivé pour la production des fruits, l'utilisation comme fourrage et comme plante cosmopolite (Rapport du ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, 2010).

3.3. Taxonomie

De nombreux auteurs ont élaboré des classifications du Genre *Opuntia*. La classification considérée comme la plus valable à ce jour est sans doute celle établie par Britton et Rose en 1963 :

- Règne : Plantes.
- Ordre : Caryophyllales.
- Sous-classe : *Caryophyllidae*.
- Famille : *Cactaceae*.
- Groupe : *Opuntiaeeae*.
- Genre : *Opuntia*.
- Sous-genre : *Platyopuntia*
- Espèces : *Opuntia ficus-indica*,
Opuntia megacantha.

Le genre *Opuntia* appartient à la famille des *Cactaceae*, ordre des *Caryophyllales* et la sous-classe des *Caryophyllidae*. La famille des *Cactaceae* compte environ 130 genres et 1500 espèces, dont 300 appartiennent au genre *Opuntia* (Mulas et al., 2004).

Le groupe des *Opuntiaeeae* comprend le genre *Opuntia*, subdivisé à son tour en quatre sous-genres : *Platyopuntia*, *Cylindropuntia*, *Tephrocactus* et *Brasiliopuntia*. Le sous-genre *Platyopuntia* comprend 150 à 300 espèces décrites, on a l'espèce *Opuntia megacantha* et la série des *ficus-indicae*, qui comprennent l'*Opuntia ficus-indica* et qui sont connues sous le nom de figuier de Barbarie (Mulas et al., 2004).

L'*Opuntia ficus-indica* et l'*Opuntia megacantha* sont parmi les cactées qui ont la plus grande importance agronomique, tant pour leur fruit comestible que pour les raquettes qui peuvent être utilisées comme fourrage ou comme légumes (Mulas et al., 2004).

La domestication d'*Opuntia ficus-indica* a commencé il y'a environ 8000 ans. Il en existe une forme épineuse et une forme inerme. De nombreux auteurs considèrent l'*Opuntia megacantha* comme un synonyme d'*Opuntia ficus-indica*, toujours considérée comme la forme inerme. La démonstration la plus évidente est que l'*Opuntia megacantha* est une forme d'*Opuntia ficus-indica* mais dans des conditions de stress, certaines cladodes de la forme inerme peuvent commencer à développer des épines. Par ailleurs, les plantes

qui proviennent à partir des graines d'espèces sans épines peuvent générer des formes épineuses, caractérisées par une grande variabilité (Mulas et *al.*, 2004).

3.4. Description morphologique

Le figuier de Barbarie est une plante arborescente, caractérisée par des tiges en forme de raquettes plates charnues et ovales pouvant atteindre 3 à 4 mètres de haut (fig.4). Les raquettes, appelées cladodes, mesurent 30 à 40 centimètres de long, sur 15 à 25 cm de large et 1,5 à 3 cm d'épaisseur. De couleur verte, elles s'unissent les unes aux autres, en formant des sortes de branches. Elles sont recouvertes d'une cuticule cireuse (la cutine) qui limite la transpiration de la plante et la protège tout en assurant la fonction chlorophyllienne à la place des feuilles. Leur surface est parsemée d'alvéoles au sein desquelles naissent, sur les cladodes en formation, des feuilles fragiles, éphémères et caduques. Elles portent de redoutables épines munies de minuscules aiguillons recourbés vers leur base. Les cladodes de la base, en vieillissant, finissent par se lignifier pour former un véritable tronc. Le figuier de Barbarie donne des fleurs et des fruits en abondance. Les fleurs apparaissent sur le dessus des raquettes, larges de 4 à 10 cm et de couleur jaune, orange ou rouge. Ces fleurs sont comestibles, comme le fruit auquel elles donnent naissance qui se présente sous la forme d'une grosse baie ovoïde et charnue, dont la peau verte jaunâtre est, elle aussi, ornée de petites épines. Dans les climats tempérés, la floraison a lieu en avril,-mai et les fruits sont cueillis fin juillet à septembre, dès qu'ils deviennent un peu mous. Dans certaines contrées arides et chaudes, la plante peut donner des fruits deux fois par an. Appelé figue de Barbarie, ce fruit a une chair d'une couleur variant du jaune clair au rouge violacé et dont le goût se révèle délicieux et subtil. Ses graines, riches en vitamines et en oligoéléments, lui confèrent de nombreuses propriétés et c'est à partir de ces graines que l'on obtient une huile très recherchée (Revue nature et santé, 2011).

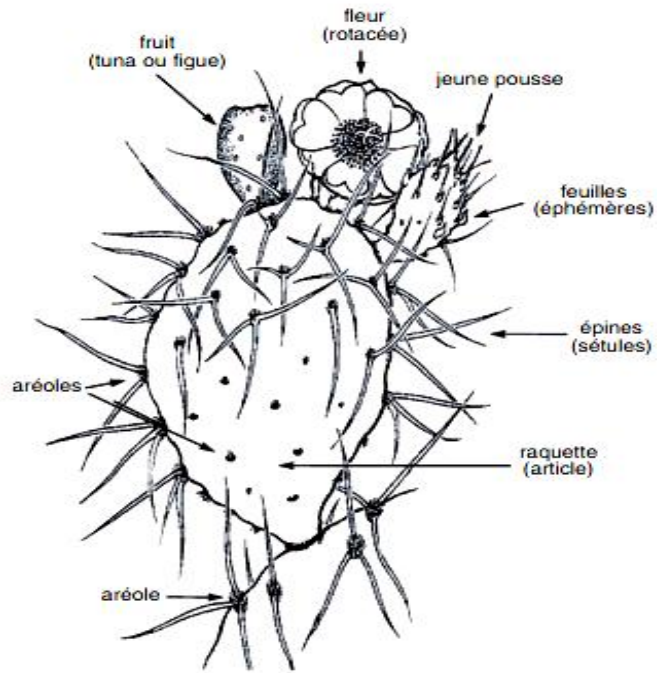


Figure 4: Schéma illustrant les différentes parties du figuier de Barbarie (Revue nature et santé, 2011).

3.5. Physiologie

Le figuier de Barbarie est une plante qui a une photosynthèse de type CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Elle a la particularité de fixer le CO_2 pendant la nuit, le stocker et de fermer ses stomates pendant le jour. Une telle stratégie permet d'éviter les pertes en eau par évapotranspiration qui peuvent avoir lieu le jour et d'optimiser ainsi l'utilisation d'eau (Stintzing et al., 2005).

Les stomates s'ouvrent uniquement la nuit, car à ce moment, la température est plus basse que durant la journée et le taux d'humidité est plus élevé. Cela provoque une faible évapotranspiration et donc de faibles pertes d'eau. C'est pourquoi les plantes CAM se sont spécialisées dans la fixation du CO_2 pendant la nuit. Cette fixation est réalisée par la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEP), qui provient de la dégradation de l'amidon et du saccharose produit dans le chloroplaste le jour. Cette fixation permet de former de l'oxaloacétate, qui sera immédiatement réduit en malate, puis stocké dans une vacuole sous forme d'acide malique, d'où le nom de plante à métabolisme acide. Autrement dit, durant la nuit, le figuier de Barbarie fait "le plein" de CO_2 sous forme d'acide malique, mais il ne peut pas le transformer tout de suite en sucre du fait de l'obscurité. En effet, comme toutes les autres plantes, les plantes CAM ont besoin de

l'énergie lumineuse du jour pour compléter le cycle de Calvin et pour ainsi accomplir la photosynthèse en entier (Goldstein et al., 1991) (fig.5).

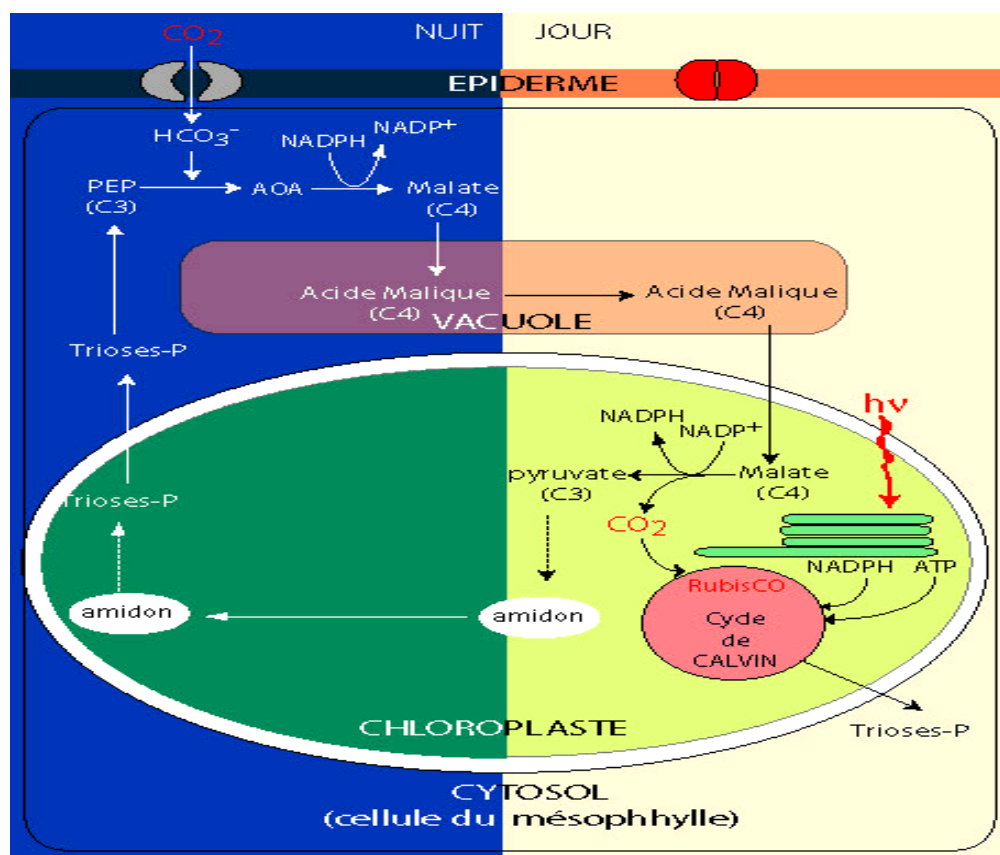


Figure 5: Photosynthèse de type CAM.

3.6. Habitat

Les cactus ont évolué et se sont adaptés à toutes sortes de biotopes. La définition généralement admise qu'un désert est un lieu où la moyenne annuelle des précipitations ne dépasse pas 250 mn. Selon cette définition seul un très faible pourcentage de cactus pousse dans de véritables déserts. La grande majorité des espèces vivent dans des biotopes où elles reçoivent chaque année au moins le double de cette quantité d'eau. Certains types de cactus apprécient des habitats encore plus humides, en particulier nombre d'espèces épiphytes des forêts sempervirentes tropicales où l'humidité atmosphérique est constamment élevée. Les cactus occupent des biotopes depuis le littoral jusqu'aux régions intérieures, du niveau de la mer à des altitudes approchant les 4000 m. Certains cactus se sont adaptés pour faire face au froid intense et à la neige ainsi que ceux poussant dans le sable à quelques mètres au-dessus du niveau de la mer (Lamb, 1991).

De point de vue écologique, l'*Opuntia ficus-indica*, même si on la trouve dans les zones où le climat est tempéré, est typiquement une espèce des zones arides et désertiques et présente, par conséquent, une série d'adaptations morphologiques et physiologiques aux caractéristiques du milieu d'origine (Mulas et al., 2004).

L'*Opuntia* présente des caractéristiques exceptionnelles qui lui permettent d'emmagasiner, dans les organes succulents, de grandes quantités d'eau. De courtes précipitations de quelques mm de pluie seulement peuvent être efficacement utilisées par cette plante grâce aux racines superficielles, mais très étendues, qui sont en mesure d'absorber l'eau dans le sol quand les niveaux d'humidité sont bas au point d'empêcher la vie de la plupart des espèces cultivées aux alentours (Mulas et al., 2004).

En l'absence de feuilles permanentes, le processus photosynthétique se réalise dans les raquettes vertes. Celles-ci contiennent également un parenchyme aquifère qui peut emmagasiner et conserver l'eau de façon efficace. L'efficacité dans la limitation des pertes en eau par transpiration cuticulaire est améliorée grâce à la présence d'un épais revêtement cireux épicuticulaire et intracuticulaire. La morphologie stomatique contribue elle aussi à limiter les pertes par transpiration, tout comme l'ensemble du processus photosynthétique. En effet, cela peut avoir lieu suivant le cycle CAM (Crassulacean Acid Metabolism) qui, comme on le sait, permet l'ouverture nocturne des stomates pour les échanges gazeux, réduisant par conséquent les pertes par transpiration (Mulas et al., 2004).

3.7. Reproduction et techniques de multiplications

Pratiquement tous les cactus ont des fleurs normalement hermaphrodites, c'est-à-dire que celles-ci possèdent des organes mâles (étamines) et femelles (carpelles). La partie réceptrice de l'organe femelle est le stigmate, à l'extrémité du pistil, et c'est cette surface qui reçoit le pollen pour qu'ait lieu la fécondation aboutissant finalement à la formation des graines. Le transport naturel du pollen s'effectue en général par hasard, du fait de nombreux types d'insectes ou d'oiseaux différents attirés par les fleurs dans leur quête de nectar, voire du pollen lui-même (Lamb, 1991).

Traditionnellement, le figuier de Barbarie est multiplié végétativement par bouturage des cladodes, en laissant sécher au préalable les sections pendant deux semaines et parfois plus (fig.6). Cette période de pré-séchage ne se justifie pas et certains travaux ont même montré ses effets négatifs sur les repousses. A la plantation, la cladode est placée dans un sillon de 15 cm, la cladode est plantée en hauteur et les deux tiers sont mises dans le sol et inclinée. Le sol est alors tassé autour de la cladode. Les distances de plantation

sont variables en fonction de la pluviométrie et du degré d'intensification de la culture. En zone aride et semi-aride (150 à 400 mm de pluie), les densités de plantation sont de 1200 à 2000 cladodes à l'hectare. Quand la pluviométrie dépasse 400 mm, ces densités peuvent être de 3200 à 5000 raquettes à l'hectare (Walali Loudyi, 1995).

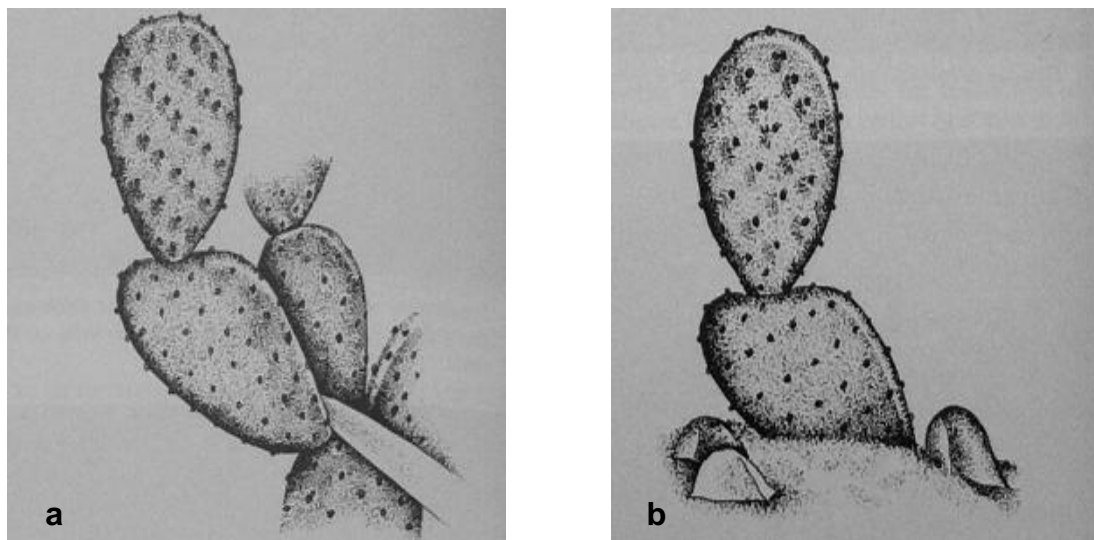


Figure 6: Schéma illustrant la technique de bouturage, (a) : meilleur emplacement pour prélever les boutures, (b) : plantation au niveau du sol (Lamb, 1991).

3.8. Exigences écologiques

Les caractéristiques écologiques du figuier de Barbarie, dépendent principalement des facteurs climatiques qui contrôlent sa croissance et sa distribution; notamment les précipitations, l'humidité atmosphérique, la température de l'hiver, la nature des sols et le drainage (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010) :

- **Température** : Le figuier de Barbarie est résistant au froid et peut supporter des gelées de l'ordre de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ses besoins en chaleur sont importants et durant la phase de croissance du fruit ils se situent entre 15 et $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il est résistant à la sécheresse et les températures moyennes annuelles de 15 à $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ lui conviennent parfaitement. Il peut supporter les fortes chaleurs qui dépassent $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. En outre, le niveau le plus bas de température où le développement est possible est l'isotherme de $1,5$ à $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de la moyenne journalière du mois le plus froid (généralement janvier) qui correspond à la moyenne mensuelle de 7 à $9\text{ }^{\circ}\text{C}$, mais avec un maximum journalier supérieur ou égal à $12\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **Précipitations** : Les exigences en précipitations sont variables en fonction de la nature des sols. En effet, pour des sols sableux et profond, le minimum de précipitation

requis tourne autour de 300 à 400 mm/an, alors que sur des sols vaseux et limoneux, la moyenne des précipitations minimales requise est de 200 mm/an; mais le cactus peut être cultivé tant que l'eau additionnelle de l'érosion permet au sol d'emmagasiner 300 à 400 mm.

- **Humidité** : L'humidité atmosphérique, en cas de grand déficit de saturation de l'atmosphère (humidité relative basse) affecte, également les espèces d'*Opuntia*. Les observations empiriques ont démontré que le figuier de Barbarie est éliminé des régions où la moyenne relative de l'humidité est au-dessous de 40% pour plus de trente jours consécutifs. Le cactus peut croître dans des régions arides et semi-arides de l'Afrique du Nord et du Proche Orient où les moyennes annuelles de l'humidité relative et la moyenne du déficit de saturation sont respectivement toujours au-dessus de 60% et sous 12%.

- **Sol** : L'espèce présente une large faculté d'adaptation avec une préférence pour les sols très perméables, sableux ou caillouteux et à faible taux d'argiles (< 20%). Il redoute des sols lourds et mal drainés. Il supporte aussi bien les sols acides que les sols très calcaires, voire salins (moins de 70 mol de NaCl / cm³)

- **Drainage** : il constitue aussi l'une des plus importantes exigences écologiques. En effet, le figuier de Barbarie est très sensible au manque d'oxygène au niveau des racines ; à cet effet, il est recommandé d'éviter les sols argileux qui peuvent être saturés temporairement et mal drainés.

Les facteurs biotiques jouent aussi un rôle important dans la culture et production du cactus. De nombreux parasites et maladies peuvent toucher le figuier de Barbarie (Walali Loudyi, 1995) :

- **Rouille** : elle se manifeste par de petites taches jaunes, circulaires, pouvant s'étendre en plaques irrégulières d'un blanc sale ou cendré. Ce sont surtout les cladodes de deux ans qui, une fois attaqués, n'émettent que peu de cladodes, et finissent par se dessécher. Elle se manifeste principalement dans les zones humides, elle est efficacement combattue par des traitements à base de cuivre et l'ablation des cladodes parasités.

- **Mildiou des cactus** : les symptômes de la maladie se présentent sous forme de cloques soulevant l'épiderme et de taches brunâtres qui envahissent les fruits et les raquettes. La sensibilité à la maladie est variable en fonction des variétés. Une lutte préventive consiste à couper et à incinérer les parties atteintes de la plante.

- **Cératite** : une mouche méditerranéenne des fruits qui peut occasionner des dégâts importants dans les plantations mal entretenues. Un insecticide de synthèse permet de se débarrasser facilement de cet insecte.

- **Cochenilles** : bien que généralement polyphages, certaines espèces de cochenilles sont des parasites spécifiques et attaquent à une seule espèce de cactée. Certains cultivars inermes de cactées sont résistants aux cochenilles. La lutte contre les cochenilles nécessite des traitements aux huiles blanches ou au parathion.

3.9. Répartition géographique

Le figuier de Barbarie est depuis longtemps cultivé au Maroc. Il a été introduit près de trois siècles au moins. Du Nord au Sud, il est le plus souvent utilisé comme haies, mais aussi pour son fruit comestible et comme fourrage pour l'alimentation du cheptel en périodes de sécheresse (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010).

Sa superficie a évolué de façon remarquable au cours de ces deux dernières décennies à cause de la sécheresse, elle est passée de 50 000 ha en 1998 à plus de 120 000 ha en 2009 enregistrant une progression annuelle de 2500 hectares (Arba, 2009). La région de Guelmim-Sidi-Ifni occupe la première place avec 50% de la superficie nationale (33 000 ha environ) et avec des rendements en fruits qui varient entre 10 et 22 t/ha. La région de Khouribga vient en troisième place et celle de Doukkala en quatrième (Arba, 2009). Au Nord du Maroc, le figuier de Barbarie est également situé dans plusieurs localités. Il se trouve dans la région de Moulay Idriss près de Meknès à des altitudes de 500 à 800m, et dans des villages avoisinants les villes de Sidi Kacem, Tétouan, Tanger, Chefchaoune (plus de 500mm de précipitations). On le trouve également dans les montagnes du Rif (Nord du Maroc), le froid hivernal limite son extension, mais il est probable que des différences de tolérance entre géotypes existent et méritent d'être explorées, quelques plantations rencontrées aux villages avoisinant les villes d'Ifrane, Azrou et Immouzer, entre autres, semble affirmer cette hypothèse. Il est aussi localisé au centre du pays, des plantations du figuier de Barbarie sont largement répandues dans le paysage rural avoisinant les villes de Marrakech, Béni Mellal et aussi dans les régions orientales aux alentours des villes d'Errachidia, Rich, Midelt, Oujda, Taourirt, Ouarzazate, etc. L'existence dans ces localités de géotypes très résistants à la sécheresse et même aux basses températures n'est pas à négliger (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010).

3.10. Espèces et cultivars

L'identification des espèces au Maroc s'est faite progressivement depuis les années 80. Ainsi Arba (2009), a décrit 3 espèces qui produisent des fruits comestibles en milieu rural : *Opuntia ficus-indica* qui est surtout cultivé au Sud ; *Opuntia megacantha* qui est fréquente dans la plupart des régions et *Opuntia shumannii* qui est présente au Sud marocain et qui produit des fruits sucrés et juteux de qualité. Par la suite, environ 40 espèces ont été identifiées (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010).

Pour ce qui est du profil variétal, trois cultivars ont été identifiés, et sont utilisés par les agriculteurs notamment dans la région d'Ait Baâmrane sur la base de leur précocité et de leurs caractères épineux. Il s'agit des cultivars : Aïssa (inerte et précoce : récolte juin à août) et Moussa (inerte et tardive : récolte septembre à décembre voire janvier et février) qui donnent des fruits juteux à pulpe jaune orangé à maturité sans oublier Achéfri (épineux) qui les entourent souvent. Dans la région du Rif, le cultivar Dellahia est très apprécié pour la qualité de ses fruits et pour ses propriétés organoleptiques. D'autres cultivars à fruit comestible existent, mais peu connus ; notamment Akria qui présente un cultivar inerte avec une floraison et une maturité semblables au cultivar Aïssa à pulpe rouge carmin acide, mais à fruit pourpre et El bayda qui est un cultivar proche de Aïssa, mais à fruit de couleur blanche (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, 2010).

Il est à noter que d'autres cultivars du cactus, se trouvent dans d'autres localités, en particulier dans les régions de Marrakech, Oued Zem, Doukkala et Casablanca, et qui sont réputés par la qualité de leur fruit, bien apprécié par le consommateur. Ces cultivars ont été identifiés et nommés par les agriculteurs eux-mêmes (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010).

3.11. Utilisations

3.11.1. Alimentation humaine

- **Fruit :** Il existe près de 200 espèces d'*Opuntia*, mais seuls les fruits d'une vingtaine d'espèces sont exploités. Les fruits sont connus par leurs teneurs élevées en sucre, minéraux et vitamines. Ils sont produits et vendus en été et en automne, selon la précocité de la variété. Au Mexique, par exemple, ces fruits comestibles appelés « tuna », sont commercialisés à l'état frais ou transformé : séchés, congelés, sous forme

de confit, de jus et d'alcool (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010).

- **Cladode** : Les jeunes cladodes sont consommées en tant que légume car elles sont tendres et fibreuses. Leur valeur nutritive est similaire à celle d'un grand nombre de légumes et feuilles. Elles sont riches en eau, en hydrates de carbone, en protéines, en vitamine C et β -carotène qui est un précurseur de la vitamine A. Ces jeunes cladodes sont appelés « Napolitos » au Mexique où elles sont considérées comme un légume traditionnel depuis des siècles. Elles sont consommées à l'état frais ou après cuisson en tant que légume vert. Elles sont conseillées pour les diabètes à diabétisme indépendant de l'insuline, car leur consommation peut améliorer le contrôle du sucre chez ces patients et peut réduire le taux du cholestérol dans le sang (Arba, 2009). Il existe d'autres produits dérivés à partir des cladodes: confiture, cornichon et cladodes confits. Alors que les cladodes ont été traditionnellement utilisés comme un substitut de viande pendant les périodes de jeûne, elles sont aujourd'hui servies avec un repas semblable à des haricots verts (Stintzing and Carle, 2005).

3.11.2. Production de fourrage pour le bétail

Elle représente la deuxième importance économique du cactus dans le monde. L'utilisation du figuier de Barbarie dans l'alimentation du bétail représente également la deuxième importance de cette plante au Maroc. Le cactus est utilisé depuis longtemps dans l'alimentation du bétail des zones arides et sa production dans ces zones est plus rentable que celle d'autres espèces fourragères comme le maïs et le sorgho. Il est cultivé comme espèce fourragère dans plusieurs pays dans le but d'assurer un stock alimentaire pour le bétail dans le cas d'une situation critique de sécheresse. Un certain nombre de pays : Mexique, USA, Brésil, Pérou, etc. produisent des quantités importantes de cladodes en tant qu'aliment pour le bétail. Les cladodes sont appréciées par le bétail, car elles sont riches en eau, en fibre, en protéine et en éléments minéraux. Leur consommation permet d'améliorer la saveur du lait et la couleur du beurre (Arba, 2009). Les cladodes sont broutées directement sur le champ par le bétail de pâturage comme ce qui se fait dans le Mexique et aux Etats-Unis où il y'a de grands ranchs de cactus pour le pâturage, ou bien elles sont récoltées et coupées pour les distribuer au bétail domestique comme ce qui se fait dans certains pays de l'Afrique du Nord comme le Maroc et la Tunisie où les plantations de cactus qui sont destinées à la production de fruits sont utilisées dans l'alimentation du bétail. En comparaison avec d'autres éléments fourragers, la valeur énergétique des raquettes est proche de celle de la luzerne avec

0,12 unité fourragère/kg. Avant de les donner au bétail, les cladodes sont déshydratés pour quelques jours afin d'éviter les diarrhées aux animaux et qui sont dues à la consommation de cladodes gorgées d'eau. Les espèces épineuses peuvent passer sous un coup de feu afin de les débarrasser des épines (Arba, 2009). En raison de leur effet laxatif attribué à la forte teneur en acide oxalique, une combinaison avec de la paille, l'atriplex, le foin de luzerne ou les tiges de maïs est recommandée. D'une autre part la faible teneur phénolique et tannin dans les cladodes facilite la digestion et améliore la production de viande (Stintzing and Carle, 2005).

3.11.3. Apiculture

Le cactus est une plante à floraison abondante et son cycle de floraison peut s'étendre de 3 à 6 mois selon la région et la variété. Sa floraison attire les abeilles en masses par leurs grandes fleurs de couleur jaune, leur pollen abondant et leur nectar. Elle assure l'activité des abeilles pour une certaine période et les autres espèces mellifères assurent leur activité pour les autres périodes de l'année (Arba, 2009).

3.11.4. Produits

- **Production des huiles :** L'huile extraite des graines du fruit du figuier de Barbarie appartient à la famille des huiles polyinsaturées comme la plupart des huiles végétales. La valeur commerciale de cette huile est intéressante en raison de ses particularités cosmétiques recherchées. Elle est riche en acide gras insaturé comme l'acide linoléique (64,43%) et l'acide oléique (18,46%). Parmi les acides gras saturés, le plus important est l'acide palmitique (12,60%) et l'acide stéarique (2,82%). Par contre, sa particularité réside dans sa richesse en matière insaponifiable (stérols et tocophérols). Cette caractéristique pourrait être un levier pour son exploitation dans le domaine de la cosmétologie; étant donné les effets bénéfiques de ces substances sur l'élasticité de la peau, le métabolisme cellulaire et la restauration de la structure cutanée. Elle possède des particularités cosmétiques remarquables, car elle prévient le vieillissement et les rides de la peau. Les graines servent également pour la préparation de crème à usage dermique (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010).

- **Production en agroalimentaire :** La transformation des raquettes et des fruits concerne :

- La conservation des cladodes : Les jeunes cladodes sont conservés en petits morceaux dans des boîtes en conserves. Des usines modernes de mise en boîte des

« Napolitos » existent au Mexique et aux Etats Unis (Arba, 2009). Les principaux produits élaborés sont : les cladodes au vinaigre, les cladodes en saumure, la confiture de cladodes, les cladodes confites et les frites de cladodes. On utilise également les cladodes comme matière première pour la production du biogaz par fermentation naturelle (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010). Des essais de conservation des jeunes cladodes sont également en cours de réalisation au sud du Maroc par des ONG (Arba, 2009).

➤ La Transformation technologique des fruits : Les fruits sont transformés en jus, en nectar, en jus concentré, en conserve, en miel, en marmelade, etc. La teneur en sucre qui est relativement élevée chez les fruits de la plupart des variétés leur permet de se transformer favorablement en produits agroalimentaires. Les fruits fermentés sont utilisés pour produire des boissons alcooliques ou l'eau de vie (Arba, 2009). Récemment, il a été démontré qu'il y'a une possibilité de produire du vinaigre à partir du jus de fruit du cactus (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010). Au Maroc, des essais de transformation des fruits en confiture sont actuellement en cours de réalisation par ses ONG du Sud qui font l'exportation de leurs produits. Le séchage des fruits au soleil est utilisé au Sud du Maroc pour la conservation de la production qui n'est pas vendue à l'état frais et de celle qui n'est pas autoconsommée (Arba, 2009).

• **Production de colorants** : les deux colorants extraits à partir de la figue de barbarie sont le carmin et la bétalaine :

➤ Carmin : c'est un colorant naturel de couleur rouge carmin (acide carminique). Actuellement il est de nouveau très recherché par les industries alimentaires et cosmétiques pour ses caractères biochimiques. Il est produit par l'élevage des cochenilles *Dactylopius coccus* et *Dactylopius opuntiae* qui sont des insectes hôtes du cactus. Les cochenilles sont collectées sur le cactus et sont séchées à l'air libre pour obtenir un produit brut qui est appelé Grana à partir duquel on peut extraire 10 à 26% de carmin. Il a été très demandé sur le marché international au début du 19ème siècle, moment où l'élevage de la cochenille à carmin était pratiqué au Sud du Maroc par la colonisation espagnole. Il a disparu par la suite à cause des colorants synthétiques et il est actuellement de nouveau recherché sur le marché international à cause de ses qualités naturelles et biochimiques (Arba, 2009).

➤ Bétalaine : le fruit de cactus de couleur rouge ou pourpre contient de la bétalaine, qui peut être utilisée principalement comme colorant d'aliments qui ne requièrent pas de traitement thermique tels que les glaces alimentaires, les yaourts, les friandises, les

desserts, les sirops et les sauces. Ces colorants naturels n'ont pas un E-numéro ; ce qui permet au produit alimentaire coloré par ces substances naturelles de garder un label Bio. Ces colorants extraits de légumes et fruits fournissent des substances supplémentaires nécessaires à l'augmentation de la valeur nutritionnelle du produit concerné. Ce qui constitue une spécificité de la bétalaine du jus de fruit de cactus c'est de préserver leur couleur à un pH situé entre 3 et 7, là où la majorité des anthocyanes communément utilisées perdent leur performance et se dégradent (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010).

- **Production cosmétique et pharmaceutique :** Le mucilage des cladodes est utilisé dans la fabrication des shampoings, des assouplissants des cheveux, des crèmes dermiques et des laits hydratants. Il est également utilisé depuis longtemps par les femmes rurales au Maroc pour assouplir leurs cheveux. Ce mucilage permet également de réduire le taux de cholestérol dans le sang. La poudre séchée des cladodes ou poudre de nopal à également un effet sur le contrôle du sucre et du cholestérol dans le sang (Fernandez et *al.*, 1990). Elle a aussi un effet amincissant et antiglycémique car, la pectine de la poudre diminue le plasma (Frati et *al.*, 1988). Le thé aux fleurs est utilisé en Sicile comme remède aux maux des reins. Des capsules qui sont faites à partir des fleurs séchées sont utilisées comme régulant diurétique et comme remède au dysfonctionnement de la prostate. Le bouilli des fleurs séchées est utilisé en pharmacopée traditionnelle au Maroc comme remède aux douleurs gastro-intestinales, aux brûlures et coups de soleil. L'huile essentielle des graines des fruits du cactus est riche en acides gras polyinsaturés, en stérols et en vitamines, elle est utilisée comme antiride naturel et pour la fabrication des crèmes dermiques antirides. L'huile essentielle des graines est actuellement extraite et commercialisée par des ONG et des petites sociétés privées dans certaines régions du Maroc. Les bouteilles d'huile sont exposées dans les manifestations nationales et régionales et le marketing du produit pour le marché étranger se fait par site web (Arba, 2009).

- **Production d'alicaments :** Les technologies mises au point récemment ont démontré la possibilité de production des alicaments sous forme de gélules ou capsules. Ce sont des aliments naturels qui ont des fonctions thérapeutiques pour le traitement des maladies comme l'obésité, le cholestérol, la constipation et les coliques. Ils contribuent à la régulation du transit de l'intestin (Rapport du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime, 2010).

3.11.5. Autres utilisations

- **Engrais vert** : Les résidus des raquettes ou des fruits et les autres parties de la plante constituent un excellent fertilisant (Revue nature et santé, 2011).
- **Protection** : Cette plante constitue des haies vives qui permettent la fixation des terrains ravinés par les pluies et stabilisent les terres sablonneuses et sont infranchissables aux animaux sauvages. Elles nécessitent peu d'entretien tout en offrant la richesse de leurs fruits et de leurs raquettes. Néanmoins, il faut tenir compte du caractère invasif de cette plante (Revue nature et santé, 2011).
- **Combustible** : C'est une plante qui fournit un excellent bois de chauffage et une flamme éclairante (Revue nature et santé, 2011).

4. Cladodes du figuier de Barbarie

4.1. Morphologie

Le terme feuilles de figuier de Barbarie est fréquemment utilisé dans la littérature pour désigner les segments de tiges aplaties de la plante qui remplacent les feuilles dans leurs fonctions. Ces tiges de cactus, les raquettes de cactus ou cladodes sont les termes corrects, synonyme de « nopales ». Les tiges sont composées d'un parenchyme blanc (tissu de base) et le contenant de la chlorophylle au sein du chlorenchyme (tissu de cortex) (fig.7). Ce dernier est recouvert d'épines (feuilles modifiées) et poils ou trichomes multicellulaires, qui forment l'aréole et qui est une caractéristique des membres de la famille des cactacées (Anderson, 2001). Les glochides sont composées de 100% de cellulose cristalline (Waldron et *al.*, 1996). Les microfibrilles de cellulose sont de 0,4 mm de longueur et de 6 à 10 µm en diamètre, et sont parallèlement ancrées dans une matrice d'arabinose. Celle-ci est en présente sous forme de gel solide, tissé et serré avec la cellulose. Les épines sont constituées de 96% de polysaccharides, qui eux-mêmes sont divisés en 49,7% de cellulose et 50,3% d'arabinose, le reste est constitué de cendres, matières grasses, cires et la lignine (Malainine¹ et *al.*, 2003). Elles mesurent 1 à 3 cm de longueur et forment 8,4% du poids total de la cladode. Leurs fonctions comprennent la protection mécanique face aux herbivores, la réflexion de la lumière, l'ombre pour la tige, et donc permettent la réduction de la perte en eau ainsi que la condensation du brouillard (Anderson, 2001).

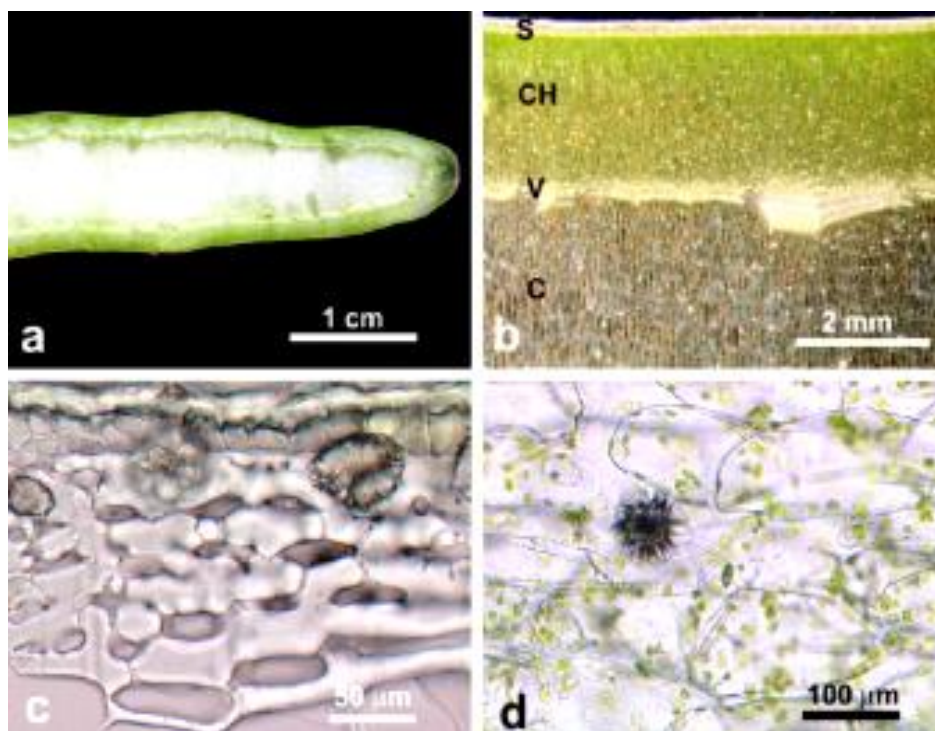


Figure 7 : Morphologie des cladodes du figuier de Barbarie, (a) : Coupe transversale (CT) de l'ensemble de la cladode ; (b) : CT des couches extérieures de la cladode montrant la peau (S), chlorenchyme (CH), vaisseaux conducteurs (V), parenchyme (C) ; (c) : CT de la peau montrant un hypoderme à parois épaisse ; (d) : CT du chlorenchyme avec des plasmides et des cristaux oxalate (Ginestra et al., 2009).

4.2. Composition chimique

La composition chimique des cladodes varie en fonction des facteurs édaphiques, l'endroit de la culture, la saison et l'âge de la plante. Par conséquent, les teneurs en éléments nutritifs respectifs varient à la fois entre les espèces et les variétés et ils ne devraient pas être pris comme des valeurs absolues (tabl.1) (Stintzing and Carle, 2005).

Tableau 1: Principaux composants des cladodes du figuier de Barbarie (Stintzing and Carle, 2005).

Composants	Matière sèche (g/100g)	Poids frais (g/100g)
Eau	-	88-95
Glucides	64-71	3-7
Cendres	19-23	1-2
Fibres	18	1-2
Protéines	4-10	0,5-1
Lipides	1-4	0,2

Les jeunes cladodes ont des valeurs élevées en glucides, en protéines, et la teneur en eau. Fait intéressant, la fertilisation faible en azote conduit à une augmentation de la teneur en protéines brutes, alors que pour l'alimentation des animaux et spécialement les vaches allaitantes, les doses d'azote recommandées sont de 224kg /ha. Un supplément de 112 kg /ha de phosphate améliore la faible teneur en phosphate des cladodes (Pimienta-Barrios et *al.*, 1994). Au cours de la croissance, l'ossature fibreuse est décomposée dans le parenchyme, mais se développe dans le cortex. Cependant, les protéines totales et les fibres diminuent avec l'âge. Le jus de cladodes présente un pH de 4,6 avec 0,45% d'acidité titrable et 6,9 g /100 g de matières sèches (Stintzing and Carle, 2005).

Les cladodes ont une haute teneur en calcium et en fibres. Elles sont moins nutritives que les épinards et plus nutritives que la laitue (Stintzing and Carle, 2005). La teneur en eau varie entre 88 à 95%, elle donne aux cladodes une valeur alimentaire en étant pauvre en calories (27 kcal /100 g) (Murillo-Amador et *al.*, 2002).

4.2.1. Composants à faible poids moléculaire

a) Minéraux

Le potassium est le principal minéral, il occupe 60% de la teneur totale en cendres (166 mg /100 g de poids frais), suivie par le calcium (93 mg /100 g de poids frais), sodium (2 mg /100 g de poids frais) et le fer (1,6 mg/100 g de poids frais) tandis que le magnésium n'a pas été détecté (Munoz de chaves et *al.*, 1995). Des études récentes ont démontré que la composition minérale est de 50 mg /100g de poids sec, 18-57 mg /100g de poids secs pour le potassium, 11-17 mg /100 g pour le calcium et magnésium, suivie du manganèse (62-103 µg /g), du fer (59-66 µg /g), du zinc (22 à 27 µg /g) et du cuivre (8-9 µg /g). Encore une fois, ces valeurs doivent être considérées comme approximatives puisque les teneurs en minéraux varient avec les espèces, le site de culture et l'état physiologique du tissu de cladode. Il est à noter que le calcium joue un rôle crucial dans la rétention d'eau des tissus succulents (Stintzing and Carle, 2005).

b) Glucides

Les glucides constituent un total de 36% à 37% de l'ensemble du poids sec des cladodes (tabl.2). La teneur en glucides est comprise entre 64 et 71 g /100 g par rapport au poids sec. Des variations peuvent dues aux facteurs agronomiques et environnementaux ainsi que l'âge de la cladode. Les jeunes cladodes sont plus riches en glucides (Ginestra et *al.*, 2009).

Tableau 2 : Composition en monosaccharides non cellulosiques des cladodes de *l'Opuntia ficus indica* (Ginestra et al., 2009).

Glucides	Matière sèche (µg / mg)
Rhamnose	7,13 ± 1,28
Fructose	0,74 ± 0,11
Arabinose	39,64 ± 1,96
Xylose	18,64 ± 0,84
Mannose	13,64 ± 0,81
Galactose	33,69 ± 2,89
Glucose	153,15 ± 6,54

c) Acides organiques

L'acide malonique et l'acide citrique représentent respectivement 36 et 178 mg /100g de poids frais (tabl.3). En revanche, les cladodes âgées ne contiennent plus d'acide malonique. L'acide tartrique et succinique ont été trouvés seulement en état de traces. L'augmentation de l'acide piscidique est due à l'augmentation avec l'âge, alors que l'acide phorbique a été réduit de moitié de la valeur initiale. Les deux acides phorbique et piscidique sont rarement rencontrés dans la nature et limités aux plantes présentant un métabolisme acide succulent (CAM) (Teles et al., 1984).

Tableau 3 : Composition des cladodes en acides organiques à deux différents temps de récolte (Stintzing and Carle, 2005).

Acides organiques	Poids frais (mg/100g)	
	6h (matin)	18h (après-midi)
Acide oxalique	35	35
Acide malique	985	95
Acide citrique	178	31
Acide malonique	36	Traces
Acide succinique	traces	Traces
Acide tartrique	traces	Traces

En outre, l'acide malique varie de 95 à 985 mg/100 g de poids frais. Il est influencé par les changements diurnes en raison du type de photosynthèse (CAM): la plante fixe le dioxyde de carbone sous forme d'acide malique et libère l'oxygène pendant la nuit pour

éviter les pertes d'eau par transpiration. Durant la journée, l'acide malique est décarboxylé en acide malonique et le dioxyde de carbone est libéré et transformé en glucose par l'action de la photosynthèse quand les stomates sont fermés. Le principal acide, cependant, est l'acide oxalique (0,61 mg /g de poids sec). Il joue un rôle intéressant avec le calcium et le métabolisme des pectines (Stintzing and Carle, 2005).

d) Acides aminés

Il existe 18 acides aminés compris dans les cladodes du figuier de Barbarie (tabl.4) (Bruckner et al., 2003). La teneur en protéine est de 11g /100 g de poids frais ou de 0,5 g/100 de poids sec (Teles et al., 1997). D'autres auteurs ont confirmé qu'elle varie entre 77-112 mg/ g de poids sec en fonction du mois de récolte (Retamal et al., 1987). Les principaux acides aminés sont la glutamine, suivie par la leucine, la lysine, la valine, l'arginine, la phénylalanine et l'isoleucine (El-Mostafa et al., 2014).

Tableau 4: La composition en acides aminés dans les cladodes du figuier de Barbarie (Bruckner et al., 2003).

Acides aminés	Poids frais (mg/100g)
Alanine	0,6
Arginine	2,4
Asparagine	1,5
Acide asparaginique	2,1
Acide glutamique	2,6
Glutamine	17,3
Glycine	0,5
Histidine	2,0
Isoleucine	1,9
Leucine	1,3
Lysine	2,5
Méthionine	1,4
Phénylalanine	1,7
Serine	3,2
Thréonine	2,0
Tyrosine	0,7
Tryptophane	0,5
Valine	3,7

e) Acides gras

Les analyses chromatographiques des lipides totaux extraits à partir des cladodes de cactus montrent que la contribution totale en acide gras est de 13,87% pour l'acide palmitique (C16: 0), 11,16% pour l'acide oléique (C18: 1), 34,87% pour l'acide linoléique (C18: 2) et 32,83% pour l'acide linoléique (C18: 3) (tabl.5). Ces quatre gras acides représentent ainsi plus de 90% des acides gras totaux. Les acides linoléiques et linoléiques constituent les principaux acides gras polyinsaturés (67,7%) (Abidi et al., 2009).

Tableau 5: La composition en acides aminés dans les cladodes du figuier de Barbarie (Abidi et al., 2009).

Acides Gras	Matière sèche (g/100g)
C12 :0	1,33
C14 :0	1,96
C16 :0	13,87
C16 :1	0,24
C18 :0	3,33
C18 :1	11,16
C18 :2	34,87
C18 :3	33,23
C20 :0	-
C22 :0	-
C22 :1	-
C24 :0	-

Une étude sur la fraction stérol de la chlorophylle présente dans le cortex (chlorenchyme) a démontré la présence de 5,0% de cholestérol, 8,0% du methylcholesterol, ainsi que 87,0% de sitostérol (Stintzing and Carle, 2005).

f) Vitamines, caroténoïdes et chlorophylles

La teneur totale de la vitamine C (acide ascorbique et déhydroascorbique) dans 100 g de matière fraîche s'élève à 22 mg, b-carotène à de 11,3 à 53,5 µg, thiamine à 0,14 mg, riboflavine à 0,6 mg et niacine à 0,46 mg (tabl.6) (Stintzing and Carle, 2005).

Tableau 6 : Composition en vitamines dans les cladodes du figuier de Barbarie (Stintzing and Carle, 2005).

Vitamines	Pour 100 g de poids frais
Vitamine C totale	7-22 mg
Niacine	0,46 mg
Riboflavine	0,60 mg
Thiamine	0,14 mg
β -Carotène	11,3 – 53,5 μ g

En ce qui concerne le profil des caroténoïdes, il y'a présence d' α -cryptoxanthine (20%), du β -carotène (36%) et de la lutéine (44%) sachant que le tout englobe une somme de 229 μ g/ g de poids sec total et de plus la valeur s'élève avec un traitement thermique (Jaramillo-Flores et al., 2003).

Alors que la lutéine est typique des légumes verts, aucune information n'est encore disponible chez les cactus. Elle accompagne habituellement la chlorophylle dans les tissus végétaux verts tels que les épinards, la laitue ou les blettes (Stintzing et Carle, 2005).

La Chlorophylle totale dans les cladodes est estimée à 12,5 mg/ 100g de poids frais, sachant que la teneur en chlorophylle (a) est de 9,5 mg dépassant la chlorophylle (b) avec 3,0 mg (Guevara et al., 2001).

g) Composants phénoliques

La teneur en polyphénols totaux dans les cladodes mexicains représentent 8 à 9 mg/ 100 g de poids frais (Rodrigues-Felix, 2002).

Parmi les acides phénoliques qui ont été détectés : acide ferulique, acide p-Coumarique, acide 4-Hydroxybenzoïque, acide caféique, acide salicylique, acide gallique. Les flavonoïdes détectés sont : rutine, iso-quercitrine, nicotiflorine, narcissine (tabl.7) (Guevara-Figueroa et al., 2010).

Tableau 7 : Composition en polyphénols des cladodes de *l'Opuntia ficus-indica* (El-Mostafa et al., 2014).

Polyphénols	Matière sèche (mg / 100 mg)
Acide gallique	0,64-2,37
Coumarique	14,08-16,18
3,4- dihydroxybenzoïque	0,06-5,02
4-hydroxybenzoïque	0,5-4,72
Acide ferulique	0.56-34,77
Isoquercétine	2,29-39,67
Isorhamnetin-3-O-glucoside	4,59-32,21
Nicotiflorine	2,89-146,5
Rutine	2,36-26,17
Narcissine	14,69-137,1

4.2.2. Composants à haut poids moléculaire

La teneur moyenne de la cellulose dans les cladodes par rapport à la matière sèche est de 11%, hémicellulose 8% et la lignine 3,9% (Ben-Thlija, 2002).

La teneur en amidon dans les cladodes fluctue en fonction des saisons et atteint une valeur moyenne de 85 à 171 mg/ g de poids sec (Retamal et al., 1987).

Les hydrocolloïdes occupent 36% du volume total de la cladode, cela est dû à leur grande capacité à gonfler. Le stockage de l'eau atteint 50% de leur poids total. Il est aussi à noter que les glucanes agissent comme source de carbone pour l'acide malique dans la CAM (Sutton et al., 1981).

La composition moyenne du sucre dans le mucilage du figuier de Barbarie est composée de 42% d'arabinose, 22% de xylose, 21% de galactose, 8% d'acide galactose turonique et 7% de rhamnose. La précipitation a été obtenue par addition de cations tel que le calcium, le plomb, le baryum, l'argent, le cuivre, le fer, le cobalt ou le nickel pour viser la déstabilisation du polyélectrolyte anionique (Nobel et al., 1992).

Il est à noter que la viscosité la plus haute du chlorenchyme a été enregistrée entre un pH 4 et 6 et étant plus faible pour le chlorenchyme. A pH entre 2 et 4, une légère augmentation a été détectée par contre il y'a pratiquement pas de modifications de viscosité entre un pH 6 et 10. Quand la valeur de pKa atteint 3,2 à 3,5 la molécule change de la forme globulaire à linéaire (Majdoub et al., 2001).

Le plus souvent dans la littérature, les auteurs ne font pas de distinction entre le mucilage et les pectines. Afin de prouver les différences chimiques de ces deux fractions macromoléculaires, un protocole d'extraction a été proposé pour les différencier. Alors que le mucilage ne forme pas un gel par addition de calcium, les pectines sont sensibles aux divalents cations. Avec le moyen de l'ultrafiltration, une séparation des molécules à un haut poids moléculaire (10%) et celle de faible poids moléculaire (90%) a été réalisée à partir d'un extrait de cladodes. Ce dernier est composé de 80% de protéines qui avaient une solubilité assez faible dans l'eau. Bien que la fraction de poids moléculaire élevé a montré une légère sensibilité vis-à-vis du calcium en solution, aucune d'augmentation de la viscosité n'a été observée lors de l'addition du calcium pour les molécules à faible poids moléculaire. Ce n'est que lorsque la concentration du mucilage augmente de 10 g/100 g d'eau, qu'il y a formation d'un gel du à des ponts intermoléculaire. Il a été conclu que la fraction de protéines en interaction avec polysaccharides forme des liaisons intermoléculaires (Majdoub et al., 2001).

4.3. Applications pharmaceutiques et cosmétiques

Traditionnellement, les cladodes de cactus contribuaient considérablement à l'alimentation humaine au Mexique et servent jusqu'à présent comme des agents thérapeutiques. En médecine populaire, elles sont utilisées pour le traitement de la gastrite, de la fatigue, de la dyspnée et des maladies du foie suite à l'abus d'alcool (Stintzing and Carle, 2005). Les cladodes chauffées ont été utilisées pour traiter le rhumatisme, les érythèmes et les infections chroniques de la peau, mais aussi pour améliorer la digestion et améliorer le processus général de désintoxication (Munoz de Chavez et al., 1995). Récemment, des effets positifs des cladodes ont été démontrés sur l'hyperglycémie, l'acidose, et l'artériosclérose. Le rôle des polysaccharides des cladodes dans le secteur des médicaments est intéressant comme la réduction du cholestérol et son action préventive du diabète et les thérapies adipeuses. Depuis qu'il a été démontré que la fraction hydrocolloïdale est également riche en protéines, davantage de recherches doivent être effectuées pour prouver si les effets positifs sont dus à des substances pectiques ou plutôt aux protéines (Stintzing and Carle, 2005). Depuis que lutéoléine est connue pour réduire considérablement le cholestérol par inhibition indirecte de la 3-HMG-CoA réductase qui est l'enzyme clé de biosynthèse du cholestérol. L'action des flavonoïdes sur le métabolisme du cholestérol serait intéressante à poursuivre (Gebhardt, 2003). Les hydrocolloïdes d'*Opuntia* pourraient être appliqués dans les crèmes similaires à l'*Aloe vera* (L.) (Eshun et al., 2004).

Chapitre 2. Propriétés antioxydantes

1. Radicaux libres et stress oxydatif

Notre organisme est normalement soumis à un stress oxydatif. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas des ressources enzymatiques et antioxydantes suffisantes pour les éliminer (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

1.1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydatif, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène. Ceci leur confère la dénomination de radicaux libres « centrés » sur l'oxygène (Delattre et *al.*, 2005).

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO) et azotées (ERN), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le radical perhydroxyle (HO_2^{\bullet}), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), le radical peroxyde (ROO^{\bullet}) et le radical alkoxyde (RO^{\bullet}). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (Favier, 2003).

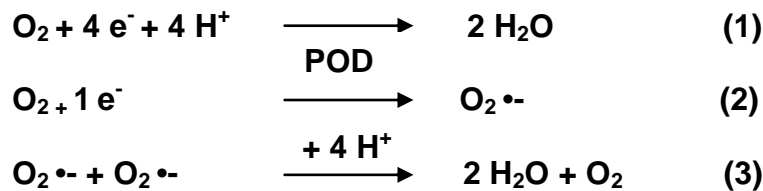
Ces radicaux libres ne sont pas seulement attribués à des phénomènes de stress oxydant. Ils peuvent être générés au cours du métabolisme normal de l'oxygène *in vivo*, mais, dans ce cas, en très faible quantité. Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons (Belyagoubi, 2011) :

- Des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie.
- Des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées.
- Du système xanthine déshydrogénase/oxydase activée lors d'ischémie-reperfusion.

- Exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV et la fumée de cigarette.

La production des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules mammifères est essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire (Delattre et *al.*, 2005).

En effet, au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale (où 85 % de l'oxygène est métabolisé), se produit la réduction complète d'O₂ par 4 électrons (réaction (1)) conduisant à la formation d'eau. Cependant cette réduction ne peut s'effectuer que par plusieurs étapes successives qui donnent naissance à des intermédiaires partiellement réduits de l'oxygène (Halliwell et *al.*, 1999). C'est ainsi qu'environ 2% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial est transformé en radicaux superoxydes O₂^{•-}. Ces derniers résultent de la réduction monoélectronique de l'oxygène due à la fuite d'une certaine proportion d'électrons de la chaîne de transport des électrons, situés dans la membrane mitochondriale (réaction (2)). Les radicaux O₂^{•-} sont des espèces potentiellement toxiques et ils sont régulés par les enzymes et les superoxydes dismutases qui catalysent leur dismutation (réaction (3)) (Halliwell et *al.*, 1999) :



Bien que le peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée, H₂O₂) ne soit pas un radical libre, mais une molécule (ayant tous ses électrons appariés), il est lui-même toxique à travers des réactions de type « réaction de Fenton », se produisant en présence de cations métalliques comme Fe²⁺ ou Cu²⁺. En effet, au cours d'une réaction de Fenton (réaction(4)), le peroxyde d'hydrogène donne naissance à des radicaux hydroxyles OH[•] qui sont les espèces radicalaires les plus délétères du stress oxydant. Le peroxyde d'hydrogènes est régulé *in vivo* grâce à la catalase qui accélère sa dismutation (réaction (5)) et la glutathion peroxydase qui catalyse sa réduction par le glutathion (tripeptide soufré) (Delattre et *al.*, 2005).



Le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle sont encore appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO), car ces espèces sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance. Toutefois, il existe d'autres ERO telles que les radicaux peroxydes RO_2^\bullet formés par attachement de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone (symbolisé par R^\bullet) (réaction (6)), les hydroperoxydes RO_2H provenant de l'oxydation d'un substrat RH (réaction (7)) ainsi que les alkoxydes RO^\bullet issus de la décomposition des hydroperoxydes (RO_2H) par des cations métalliques (réaction (8)) (Delattre et *al.*, 2005).



Au cours des phénomènes de stress oxydant, ces diverses entités radicalaires et moléculaires sont produites d'une manière accrue, ce qui se traduit par de nombreuses dégradations oxydatives au niveau des macromolécules biologiques telles que les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Ces lésions oxydatives sont impliquées dans plusieurs pathologies (athérosclérose, diabète sucré, maladies neurodégénératives, maladies articulaires, cancer) ainsi que les phénomènes d'ischémie-reperfusion (cardiaque ou cérébrale) et le processus de vieillissement. Les antioxydants endogènes et exogènes apparaissent comme des systèmes moléculaires susceptibles de limiter les effets des ERO et donc de protéger, d'une manière plus au moins efficace, les matériaux biologiques vis-à-vis des phénomènes de stress oxydant (Delattre et *al.*, 2005).

1.2. Moyens de défense contre les radicaux libres

Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés dans 3 catégories (fig.8) : la prévention à temps plein, la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (Virot, 2004) :

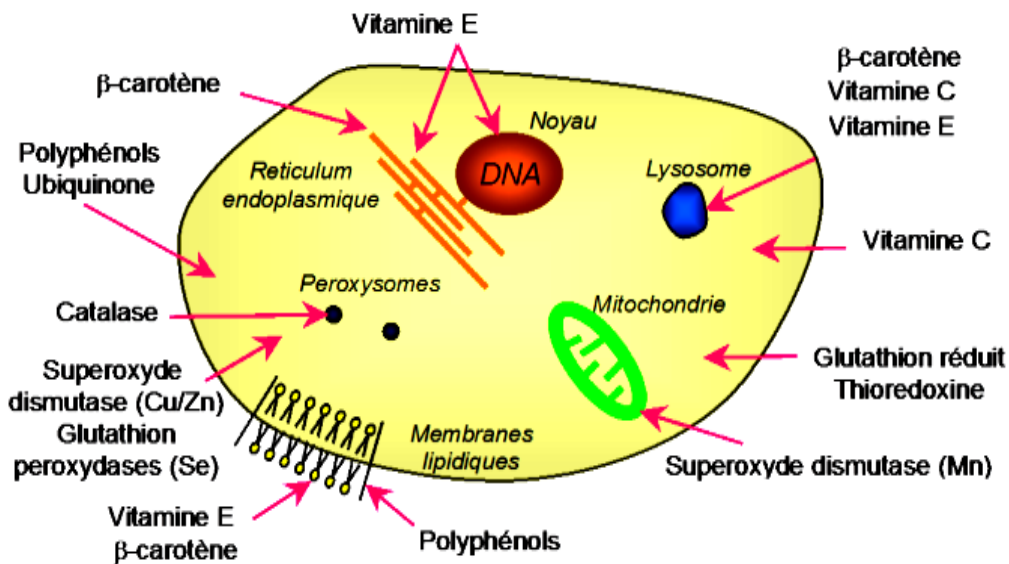


Figure 8 : Schéma illustrant les molécules intervenant dans les protections cellulaires (Virot, 2004).

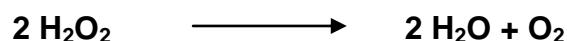
- **Prévention à plein temps** : C'est un système qui agit en permanence pour prévenir la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (Fe, Cu) ou exogènes (quinone) susceptibles de les générer. Par exemple, la liaison de la transferrine (protéine chélatrice) avec deux atomes de fer ferrique par molécule à pH physiologique rend ce métal incapable d'être impliqué dans les mécanismes d'oxydoréduction générateurs de radicaux libres.

- **Détoxification active à la suite d'une attaque oxydante** : Ce système de défense repose principalement sur 3 enzymes (Valko et *al.*, 2006) :

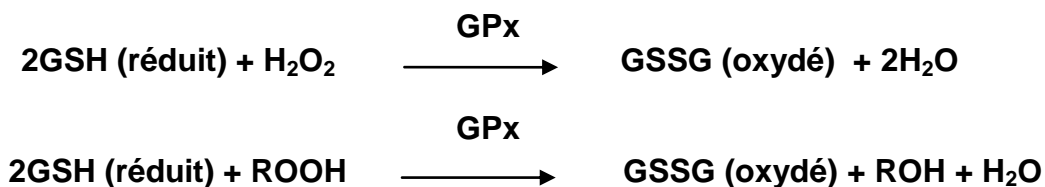
- **Superoxyde dismutase (SOD)** : Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène peroxyde (H_2O_2) et en oxygène.



- **Catalase** : Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes. Elle permet de convertir deux molécules de H_2O_2 en deux molécules H_2O et O_2 .



- **Glutathion peroxydase** : C'est une enzyme à cofacteur de sélénium localisé dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques ($ROOH$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).



- **Détoxification passive** : Elle permet la réduction des radicaux oxygénés qui ont pu passer les deux premières lignes de la défense. Elle inclut tous les antioxydants non enzymatiques capables de neutraliser les radicaux libres par des molécules telles que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes, l'albumine, l'acide urique, les polyamines, l'acide lipoïque, etc. (Valko et *al.*, 2006).

2. Antioxydants

Les antioxydants sont des molécules ou microconstituants capables d'interférer avec les radicaux libres. Un bon antioxydant se devra de respecter quelques critères (Valko et *al.*, 2006):

- Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres.
- Chélaté des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{2+}) d'importance biologique capable de promouvoir la production de radicaux libres par la réaction de Fenton.
- Interagir avec d'autres antioxydants, et, dans la mesure du possible, les régénérer.
- Avoir un effet positif sur l'expression génétique.
- Être rapidement absorbé.
- Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques.
- Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire.

2.1. Antioxydants enzymatiques

Les principaux systèmes antioxydants enzymatiques les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase (Valko et *al.*, 2006).

2.2. Antioxydants non-enzymatiques

2.2.1. Antioxydants endogènes

Les antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols :

- **Glutathion** : thiol majoritaire, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, in vivo, avec les radicaux OH^\bullet , RO_2^\bullet , RO^\bullet , $^1\text{O}_2$, ONOO^- , des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl (Delattre et al., 2005).

- **Acide lipoïque** : composé appartenant aux thiols, ses deux formes oxydée et réduite présentent des propriétés antioxydantes in vitro en piégeant les OH^\bullet , RO_2^\bullet , l' HOCl et l' $^1\text{O}_2$. En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet de les désactiver d'un point de vue catalytique, et a la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes (Packer et al., 2001).

- **Acide urique** : présent sous forme d'urate à pH physiologique, il possède des propriétés antioxydantes in vitro contre les OH^\bullet et RO_2^\bullet , tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine (Delattre et al., 2005).

2.2.2. Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et les composés phénoliques (Valko et al., 2006).

- **Vitamine C ou acide ascorbique** : c'est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes et elle est non synthétisée par l'Homme. Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (Retsky et al., 1999). Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH^-) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AscH^\bullet), stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protonée radicalaire faiblement réactive est privilégiée ($\text{Asc}^{\bullet-}$) (fig.9) (Valko et al., 2006).

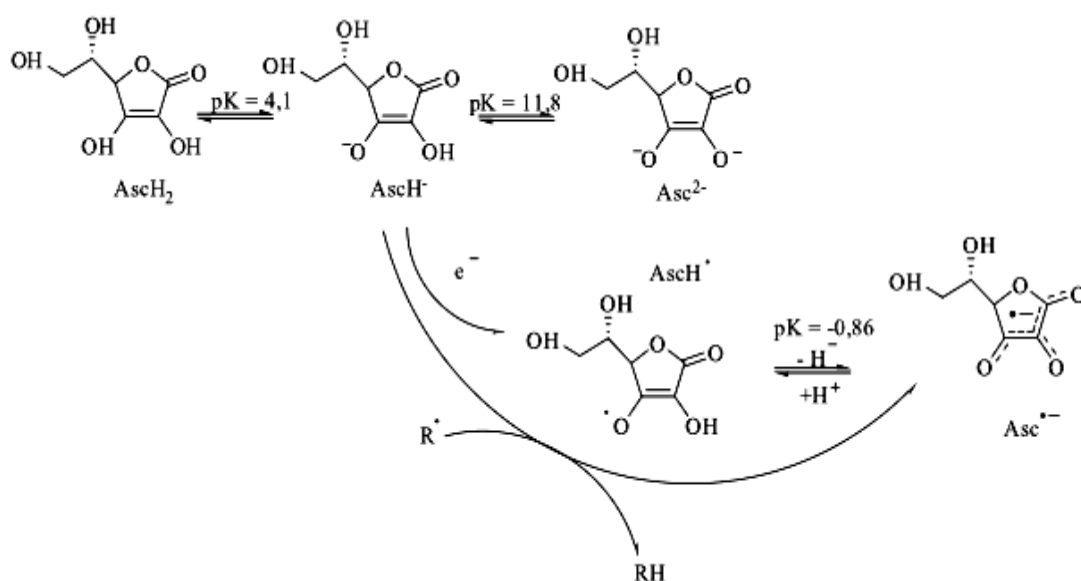


Figure 9 : Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux.

Paradoxalement, les études in vivo de la supplémentation en vitamine C montrent, pour la plupart, une réduction de l'oxydation de l'ADN, des protéines et de la lipoperoxydation, alors que certains auteurs relatent l'effet pro-oxydant in vitro de cette molécule dans des milieux tamponnés contenant du fer en accélérant la réaction de Fenton (Valko et al., 2006).

- **Vitamine E** : c'est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (ensemble de 8 molécules, dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols) (fig.10) (Yoshida et al., 1993).

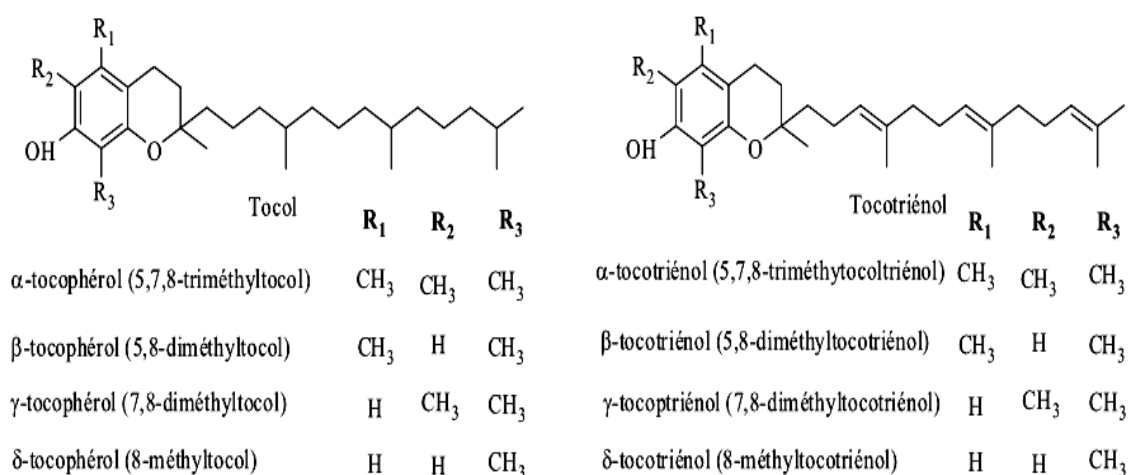


Figure 10 : Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols

Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais ils sont surtout connus pour leur rôle physiologique chez l'Homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines. Elle préviennent l'apparition d'hydropéroxydes en piégeant les radicaux LOO• selon la réaction suivante (Yoshida et al., 1993) :



- **Caroténoïdes** : ce sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles (fig.11). On en dénombre environ 600 présents dans la nature.

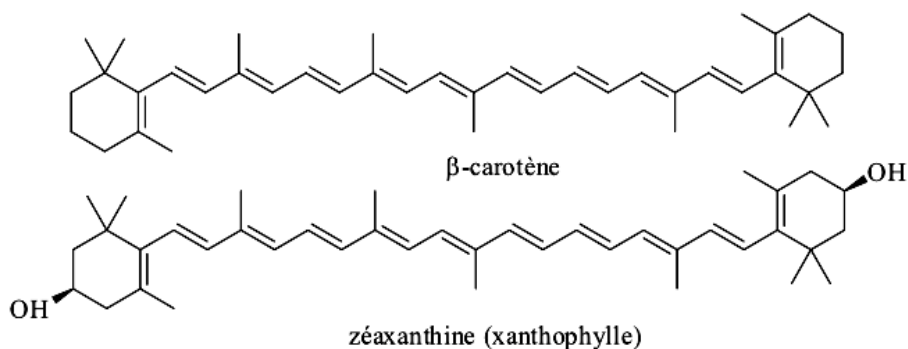
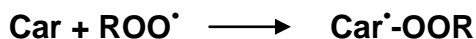
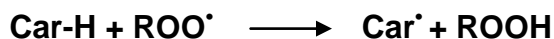
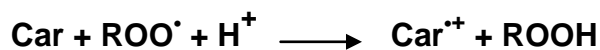


Figure 11 : Exemple de carotène et de xanthophylle.

L'activité antioxydante de ces composants est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO^\bullet , OH^\bullet , O_2^\bullet , R^\bullet par simple addition électrophile et transfert d'électrons. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet selon les réactions suivantes (Valko et *al.*, 2006) :



- **Composés phénoliques** : c'est en particulier les flavonoïdes, qui sont des métabolites secondaires des plantes caractérisées par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane (fig.12) (Leopoldini et *al.*, 2011).

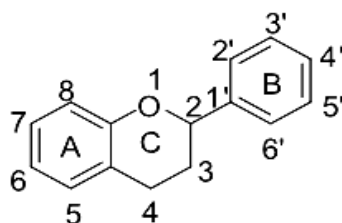


Figure 12 : Structure chimique de la 2- phénylbenzopyrane.

Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (fig.13) (Leopoldini et *al.*, 2011). De façon générale, l'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants, en particulier du nombre de groupements hydroxyles (Schroeter et *al.*, 2002).

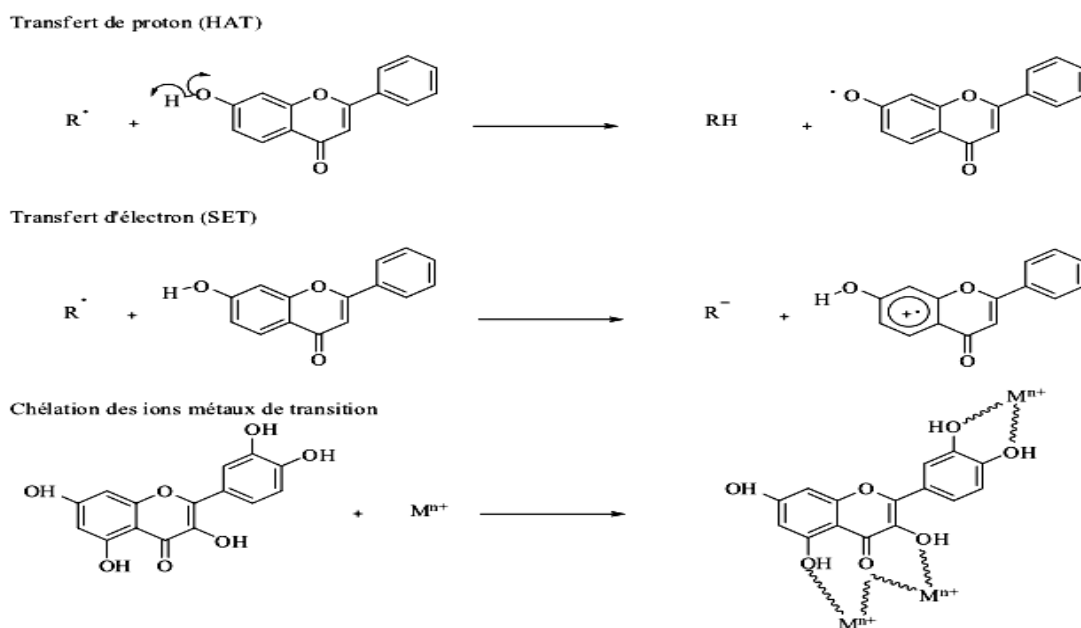


Figure 13 : Mécanismes d'actions antioxydantes des composés phénoliques (Leopoldini et *al.*, 2011).

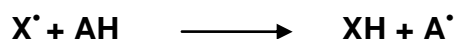
3. Mécanismes de réactions de l'activité antioxydante in vitro

L'activité antioxydante et antiradicalaire mesure le pouvoir des antioxydants à inhiber ou retarder l'oxydation (Mancebo-Campos et *al.*, 2014). Il existe plusieurs méthodes qui mesurent l'inhibition de l'oxydation des lipides et des lipoprotéines in vitro ainsi que celle mesurant le pouvoir antioxydant in vivo chez les animaux ou l'Homme (Prior et *al.*, 2005). Nous allons nous focaliser sur l'évaluation in vitro de l'activité antioxydante.

Les antioxydants peuvent inhiber les radicaux libres suivant deux principaux mécanismes, les réactions de transfert d'électrons et les réactions de transfert d'ions d'hydrogène (H^+). Le résultat final est le même, quel que soit le mécanisme, mais la cinétique et le potentiel de réactions secondaires sont différents. Les deux mécanismes peuvent se produire en parallèle, et le mécanisme dominant dans un système donné sera déterminé par la structure et les propriétés de l'antioxydant, sa solubilité et le système du solvant. L'énergie de dissociation et le potentiel d'ionisation sont les deux facteurs majeurs qui déterminent le mécanisme et l'efficacité d'un antioxydant (Wright et *al.*, 2001).

3.1. Réactions de transfert de proton d'hydrogène

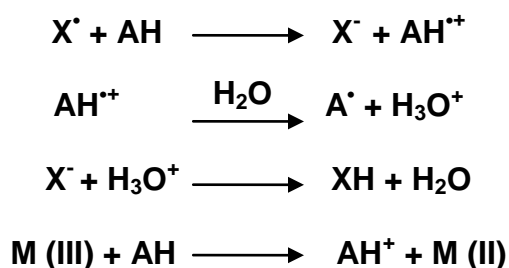
Elles mesurent la capacité d'un antioxydant à neutraliser les radicaux libres par le transfert d'un proton hydrogène ($AH = H^+ + A^-$ donneur) (Prior et *al.*, 2005).



Où X^{\bullet} est le radical libre et AH l'antioxydant. Elles sont indépendantes du pH et du solvant et sont généralement assez rapides et durent quelques secondes à quelques minutes. La présence d'agents réducteurs, y compris les métaux, complique ce genre de réactions et peut conduire à une très forte réactivité apparente (Prior et *al.*, 2005).

3.2. Réactions de transfert d'électrons

Elles mesurent le potentiel d'un antioxydant à transférer un électron et réduire n'importe quels composés à savoir les métaux, les carbonyles et les radicaux (Prior et *al.*, 2005).



Où X est le radical libre, AH l'antioxydant et M (III) un métal. Ces réactions sont dépendantes du pH et la réaction de terminaison est souvent très lente. Les traces de composants et contaminants, en particulier les métaux, interfèrent avec les réactions de transfert d'électrons et peuvent donner lieu à une grande variabilité des résultats (Prior et *al.*, 2005).

Il existe plusieurs méthodes chimiques pour le dosage in vitro de l'activité antioxydante. Les trois méthodes réalisées pour notre étude sont : test FRAP (Activité antioxydante) et les deux tests DPPH et ABTS (activité antiradicalaire).

Chapitre 3. Polyphénols

1. Généralités

Les polyphénols sont des composés naturels, exclusivement synthétisés dans le règne végétal. Leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques des plantes (Bhooshan Pandey et *al.*, 2009).

On les trouve principalement dans les fruits, les légumes, les céréales et les boissons. Les fruits comme les raisins, les pommes, les poires, les cerises et les baies contiennent jusqu'à 200 à 300 mg de polyphénols par 100 g de poids frais. Généralement, une tasse de thé ou de café contient environ 100 mg de polyphénols. Les céréales, les légumes secs et le chocolat sont également riches en polyphénols (Bhooshan Pandey et *al.*, 2009).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des plantes et sont généralement impliqués dans la défense contre le rayonnement ultraviolet ou l'agression par des agents pathogènes. Ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal comme la croissance ou la reproduction (Bhooshan Pandey et *al.*, 2009).

Dans les aliments, les polyphénols peuvent contribuer à la stabilité de l'amertume, l'astringence, la couleur, la saveur, l'odeur et l'oxydation. Vers la fin du 20^{ème} siècle, les études épidémiologiques et les méta-analyses associées ont fortement suggéré que la consommation à long terme de régimes alimentaires riches en polyphénols végétaux offrait une certaine protection contre le développement des cancers, des maladies cardiovasculaires, du diabète, de l'ostéoporose et des maladies neurodégénératives. Les polyphénols et phénols alimentaires font l'objet d'un intérêt scientifique croissant en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine (Bhooshan Pandey et *al.*, 2009).

Par ailleurs, leurs implications dans les phénomènes de brunissement enzymatique en fait un paramètre incontournable à maîtriser au cours du processus technologique lors de la transformation des produits d'origine végétale (Sarini-Manchado et *al.*, 2006).

Les polyphénols ont une très large gamme de structures chimiques (8000 composés connus) ce qui permet de les utiliser dans des domaines variés tel que l'agroalimentaire et la pharmacologie (Collin et *al.*, 2011).

2. Structure et classification

Les polyphénols sont classés en 4 familles (fig.14) : les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes et les lignines et subérines (Collin et *al.*, 2011).

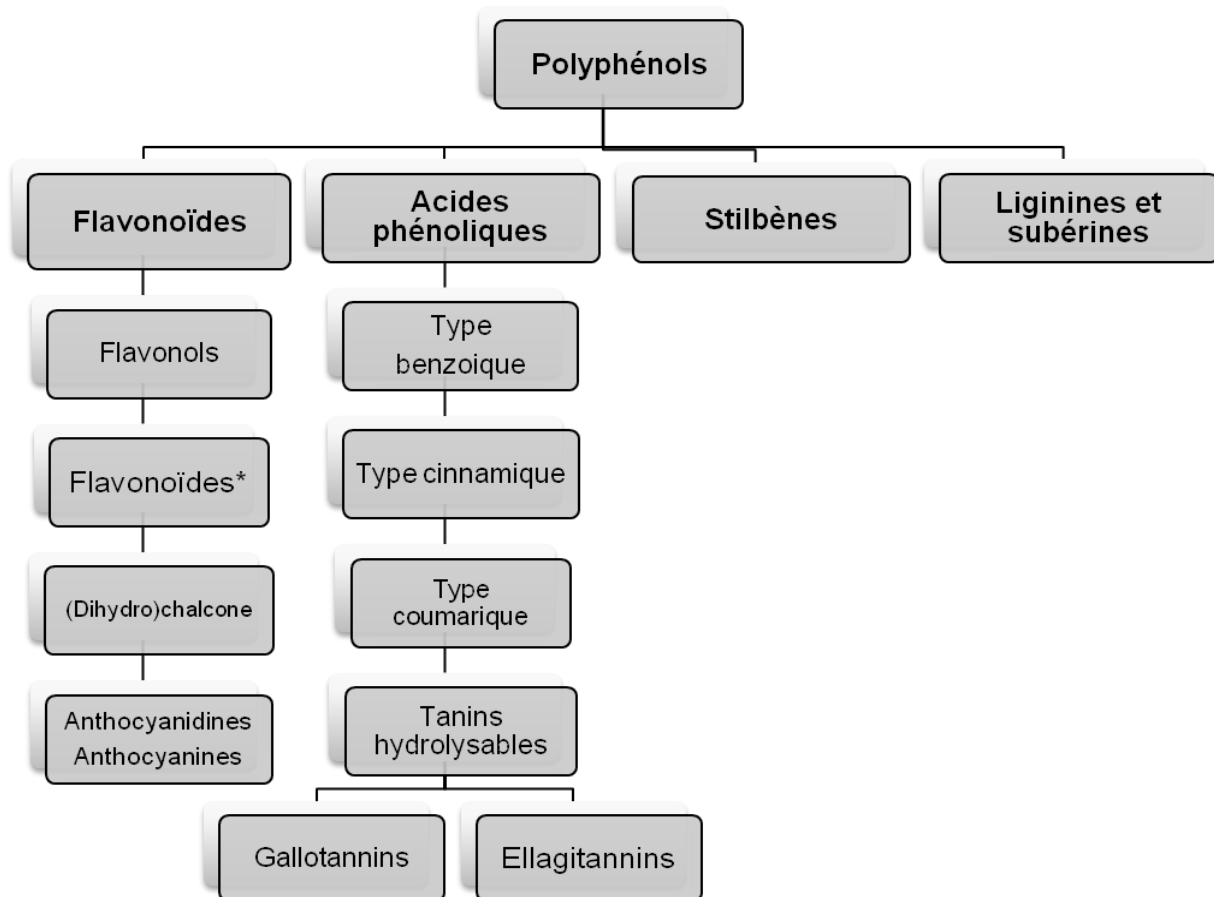


Figure 14 : Différentes familles de polyphénols^(*) : Polymères de flavonoïdes=proanthocyanidines, anthocyanogènes ou procyanidols.

Les composés phénoliques sont des substances chimiques possédant dans leurs structures un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (Bloor, 2001).

2.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), correspondant à la structure du diphenylpropane (fig.15). Au sein des flavonoïdes, on retrouve les flavonols, les flavones, les flavonoïdes et les tanins condensés, les (phényl)chalcones et les dihydrochalcones ainsi que les anthocyanines et anthocyanidines (Collin et *al.*, 2011).

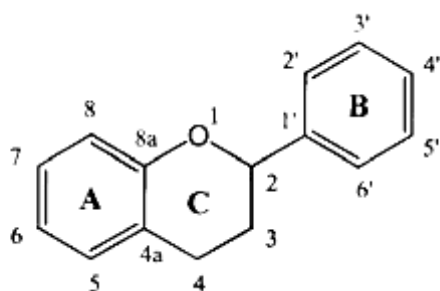
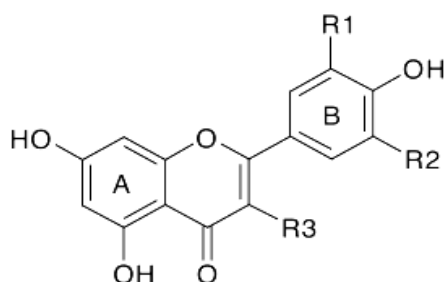


Figure 15 : Structures de base des flavonoïdes

2.1.1. Flavonols

Ils se caractérisent par un hétérocycle oxygéné relativement oxydé (fig.16). Ils existent principalement sous des formes glycosylées (glucose, xylose, arabinose, galactose, rhamnose) (Collin et *al.*, 2011). Les flavonols sont les flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempférol et la quercétine. Cette dernière est connue pour posséder un très fort pouvoir antioxydant en raison de sa structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres. A des concentrations de l'ordre de 15 à 30 mg/kg de matière fraîche, on les rencontre dans l'oignon, les brocolis, les poireaux et les myrtilles. La glycosylation avec un glucose ou un rhamnose est très fréquente (Manach et *al.*, 2004).



Flavonols	R ₁	R ₂	R ₃
Kaempférol	H	H	OH
Quercétine	OH	H	OH
Myricétine	OH	OH	OH
Isorhamnétine	OCH ₃	H	OH
Rutine	OH	H	Rutinosé

Figure 16 : Structures chimiques des flavonols.

2.1.2. Flavonoïdes et flavones

Ils possèdent également la structure de base C6-C3-C6 (fig.17). Les flavonoïdes se polymérisent au départ de 3,4-flavandiols (ou flavan-4-ols) et de flavan-3-ols (Collin et *al.*, 2011).

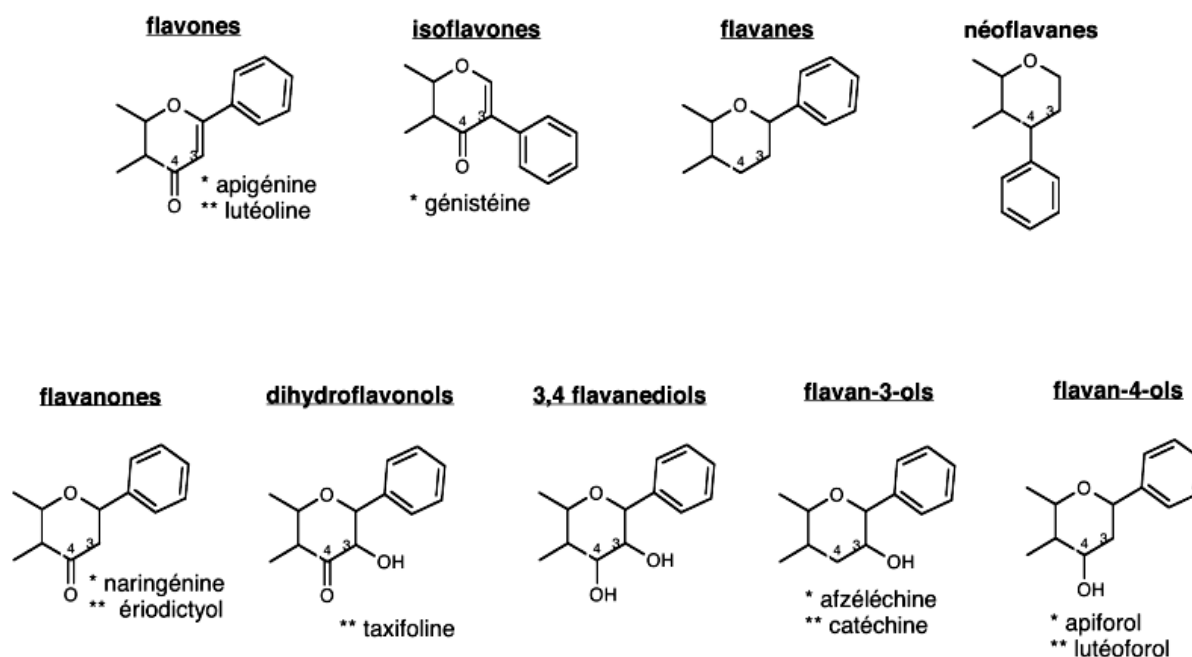
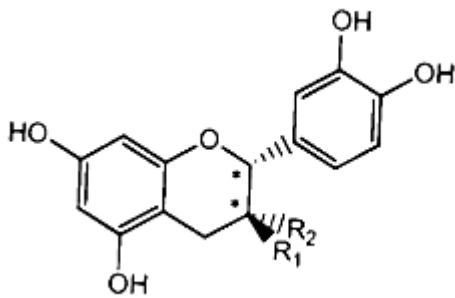


Figure 17 : Structures chimiques des différents flavones et flavonoïdes.

- **Flavones** : De tous les flavonoïdes, ils constituent la sous classe la moins abondante dans les fruits et légumes. Ils sont essentiellement constitués de lutéoline et apigénine glycosylés. Les seules denrées comestibles connues à ce jour qui en possèdent sont le persil et le céleri (Manach et *al.*, 2004)
- **flavanones** : Dans l'alimentation, les flavanones se retrouvent dans les tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents en quantités importantes dans le citron. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'héspéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron. La position 7 est le siège de la glycosylation (El Gharras, 2009).
- **Isoflavones** : Ce sont les produits dérivés du soja qui sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation et qui peuvent être glycosylées ou non. On les rencontre aussi dans les légumineuses (El Gharras, 2009).
- **flavanols** : Ils existent sous forme de monomères, dont l'unité la plus simple est la catéchine (fig.18), et sous forme polymérique appelés les proanthocyanidines. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme, mais encore dans le chocolat et le thé qui sont les principales sources de ce composé (El Gharras, 2009).



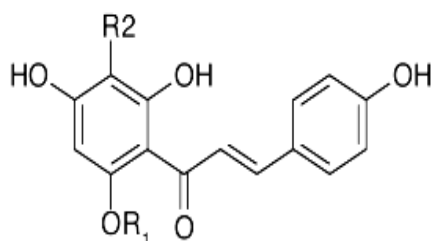
Flavan-3-ols	R ₁	R ₂
(+)-catéchine	OH	H
(+)-épicatéchine	H	OH

Figure 18 : Structures chimiques des catéchines.

- **Procyanidines** : Les termes proanthocyanidine, anthocyanogène ou procyanidol (B3, C2, ...) seront fréquemment utilisés pour les oligomères (respectivement 2,3, ... unités). L'appellation de flavonoïdes simples sera conservée jusqu'à 7 à 8 unités. Pour un plus grand nombre d'unités monomériques, le terme tanins sera retenu. Il existe deux types de procyanindes A et B (Santos-Buelga et al., 2000). Ils entrent en grande partie dans la composition des raisins où ils sont localisés dans les graines et la peau. Le degré de polymérisation de ces composés varie en fonction de l'organe végétal : entre 1 et 20 pour la graine et en moyenne 30 pour la peau. L'aptitude de ces composés à s'associer avec les protéines salivaires leur confère la propriété d'astringence que l'on retrouve chez certains fruits (raisin, pomme, poire) et certaines boissons (thé, vin, bière) (El Gharras, 2009).

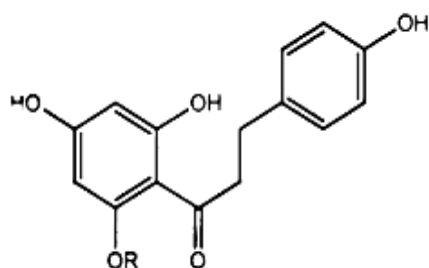
2.1.3. (Prényl) chalcones et dihydrochalcones

Les prénylchalcones ont des structures ouvertes de flavonoïdes ne possédant pas d'hétérocycle central (fig.19). Cependant, les dihydrochalcones ne possèdent pas de double liaison conjuguée au carbonyle (fig.20) (Stevens et al., 1999).



Chalcones	R ₁	R ₂
Xanthohumol	CH ₃	isoprényle
Desméthylxanthohumol	H	isoprényle
3'-Géranylchalconaringénine	H	géranyl

Figure 19 : Structures chimiques de quelques phénylchalcones.

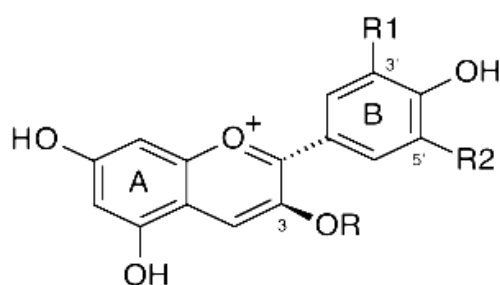


Dihydrochalcones	R
Phlorétine	H
Phloridzine	glucide

Figure 20 : Structures chimiques de quelques dihydrochalcones.

2.1.4. Anthocyanidines et anthocyanines

Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavonoïde » chargé positivement (C6-C3-C6). Ce dernier portera le nom d'anthocyanine ou anthocyanidine suivant qu'il soit glycolisé ou non (fig.21) (Vivas de Gaulejac, 2001). Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanines (Clifford, 2000).



Anthocyanidines	R ₁	R ₂
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃
Péonidine	OCH ₃	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH ₃	OH
Cyanidine	OH	H

Figure 21 : Structures chimiques de quelques anthocyanidines.

Ce sont des pigments naturels colorés que l'on retrouve dans les plantes vasculaires. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin). Une caractéristique importante de ces composés réside dans leur aptitude antioxydante, et de nombreuses études sur leurs activités biologiques peuvent en témoigner (Castaneda-Ovando et al., 2009).

2.2. Acides phénoliques et tanins hydrolysables

On distingue parmi les acides phénoliques, les dérivés de l'acide benzoïque, les dérivés de l'acide cinnamique et les coumarines tous possédant une structure du type (C6-C3) (Hollman, 2001).

2.2.1. Acides hydroxybenzoïques

Les structures varient selon les hydroxylations et les méthoxylations sur le cycle phénolique aromatique (fig. 22) (Clifford, 2000). On les retrouve dans les mangues et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres (Manach et al., 2004).

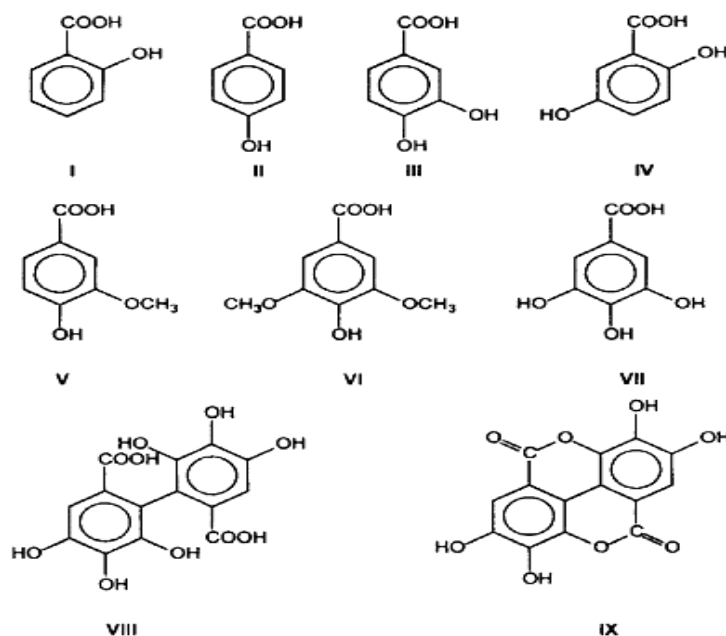
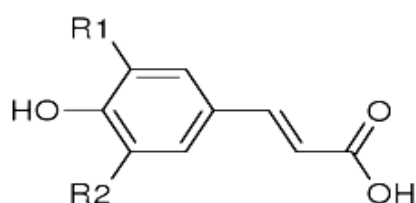


Figure 22 : Structures chimiques de quelques acides hydroxybenzoïques : I : acide salicylique ; II : acide 4-hydroxybenzoïque ; III : acide protocatéchique ; IV : acide gentisique ; V : acide vanillique ; VI : acide syringique ; VII : acide gallique ; VII : acide hexahydroxydiphénique ; IX : acide ellagique.

2.2.2. Acides hydroxycinnamiques

Ils sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement composés de l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (fig.23).



Acides hydroxycinnamiques	R ₁	R ₂
Acides p-coumarique	H	H
Acide caféique	OH	H
Acide 3,4,5 trihydroxycinnamique	OH	OH
Acide férulique	OCH ₃	H
Acide sinapique	OCH ₃	OCH ₃

Figure 23 : Structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques (C6-C3).

L'acide caféique se combine avec l'acide quinine pour former l'acide chlorogénique, que l'on retrouve dans de très nombreux fruits et à forte concentration dans le café (El Gharras, 2009).

2.2.3. Coumarines

Elles sont présentes dans de nombreux végétaux. Elles ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides ortho-hydrocinnamique. Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexique. Elles sont connues pour leurs propriétés anti-coagulantes (Vivas de Gauljac, 2001).

2.2.4. Tannins hydrolysables

Ce sont des esters d'acides phénoliques (acide gallique ou ellagique) associés à un polyol (habituellement le glucose) (Clifford, 2000). Ils sont divisés en ellagitannins et gallotannins (fig. 24) (Vivas de Gauljac, 2001).

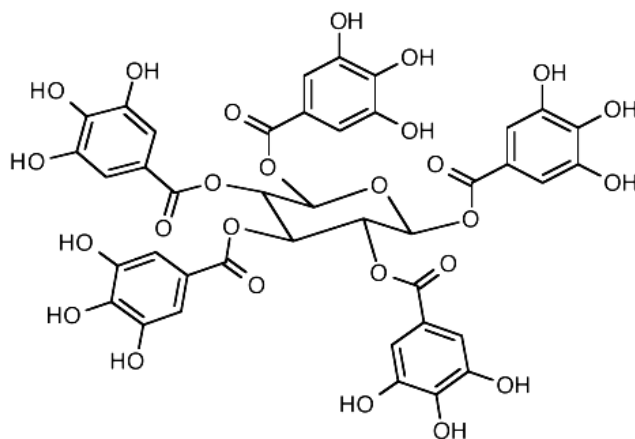


Figure 24 : Structure chimique d'un gallotannin.

2.3. Stilbènes

Il existe plus de 30 stilbènes présents naturellement dans le règne végétal. La structure chimique de base des stilbènes est composée de deux cycles aromatiques joints par un pont méthylène. Les deux formes isomères des stilbènes (cis et trans) ont des propriétés chimiques et biologiques différentes. Des interconversions trans/cis sont observées en présence de chaleur ou des rayonnements U.V. (fig.25) (Hart, 1981).

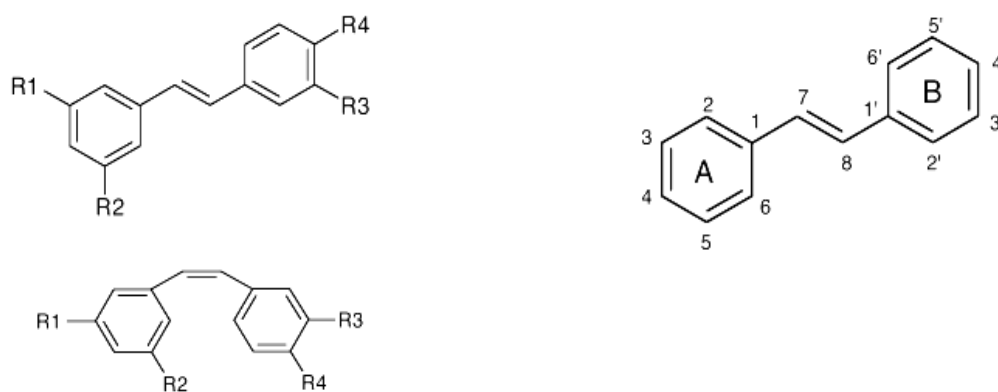


Figure 25 : Structures de base des stilbènes hydroxylés.

Ces composés sont présents en très petite quantité dans notre alimentation. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol, qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques des plantes médicinales (El Gharras, 2009). Les dimères et trimères du resvératrol sont présents essentiellement dans le raisin après élicitation U.V. ou à l'ozone. Les plus connus sont les viniférines (Collin et *al.*, 2011).

2.4. Lignines et subérines

Ce sont des précurseurs de polymères pariétaux des plantes constituant des facteurs de défense contre les agents pathogènes. Chimiquement, les lignines sont des polymères d'alcools coniféryfiques, sinapyliques et p-coumarique (dérivant respectivement des acides férulique, sinapylique et p-coumarique). Par contre, les subérines sont des polyesters des acides férulique et p-coumarique avec des acides aliphatiques (Renault-Roger et *al.*, 2002).

3. Voies de biosynthèse des polyphénols

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines, mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ils sont formés, à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire, par la voie bien connue de l'acide shikimique, conduisant à la formation de phénylalanine, qui par désamination, donne le précurseur immédiat des phénols et de l'acide cinnamique. La séquence de biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques : acides coumariques, caféiques, féruliques et sinapiques,

généralement présents dans le matériel végétal sous forme d'esters (esters quiniques comme l'acide chlorogénique, esters glucosés, etc.) ou de glucosides (fig. 26) (Richard et al., 1995).

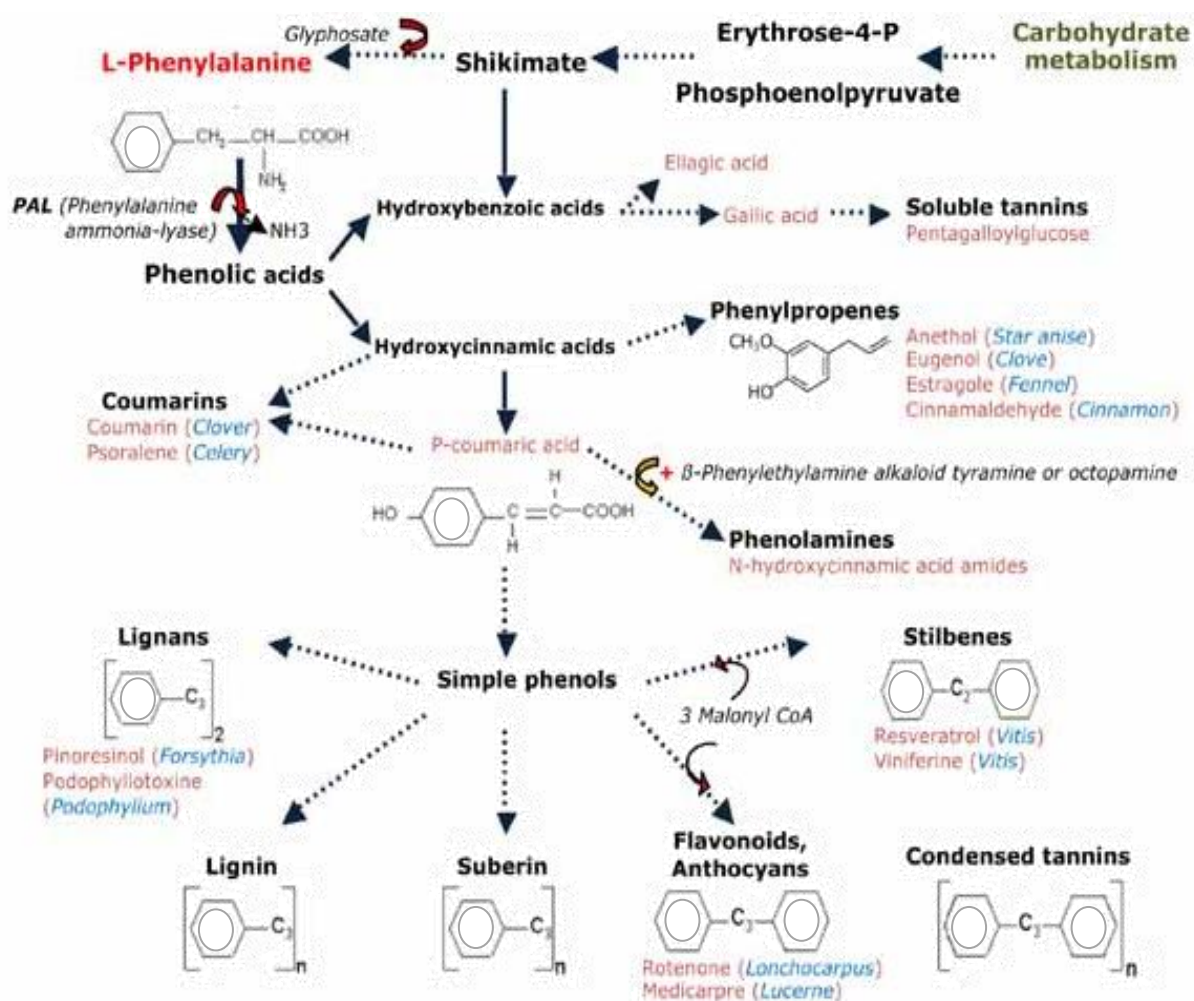


Figure 26 : Voies simplifiées de la synthèse des polyphénols (Douce, 2005).

Les formes métaboliquement actives des acides hydroxycinnamiques sont leurs esters avec le coenzyme A qui leur permettent d'accéder aux principales classes de composés phénoliques (Richard et al., 1995) :

- **Acides benzoïques :** Par β -oxydation (acide gallique, protocatéchique ...). L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tanins hydrolysables (tanins galliques et ellagiques).
- **Esters chlorogéniques :** Par estérification avec un acide alcool (acides quinique, tartrique, shikimique ...).
- **Coumarines :** Par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycolysations, prénylations ...).

- **Lignines** : Par réduction, il y a formation de monolignols suivie d'une polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases.

- **Flavonoïdes** : Le squelette moléculaire de base a une double origine : 3 molécules d'acétyl CoA (CoA= coenzyme A) pour le cycle A, une molécule de *p-coumaroyl* Co A pour le cycle B et l'hétérocycle C. C'est alors, à partir de la chalcone ainsi formée par cette condensation chimique que vont être mis en place les flavonoïdes appartenant aux diverses classes, en particulier des pigments comme les anthocyanes et les flavonols dont la polymérisation conduira aux tanins condensés. La biosynthèse des différents groupes de flavonoïdes implique un ensemble complexe de réactions comprenant les hydroxylations, méthylations, oxydations, réductions, glycolisation ...

4. Propriétés des polyphénols

4.1. Propriétés gustatives

Les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques se caractérisent par des seuils de perception d'amertume ou d'astringence relativement élevés (Meilgaard, 1975). Leurs dérivés décarboxylés génèrent par contre des arômes phénoliques (clou de girofle, fumé) avec un seuil de perception beaucoup plus faible. A l'instar de l'astringence, l'instabilité colloïdale est due à des interactions entre les polyphénols et les protéines (Collin et *al.*, 2011).

4.2. Propriétés antioxydantes

Une propriété importante des groupements hydroxyles des phénols est leur acidité due à la labilité des protons acides, qui entraîne la formation d'anions phénoxydes stabilisés par résonance (fig.27). Cet anion a la possibilité de perdre un électron pour former un radical, l'électron lui, peut être récupéré par un radical libre (Sartori-Thiel, 2003). La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, donc une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical (Leopoldini et *al.*, 2011).

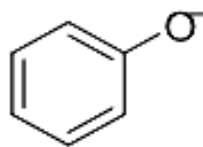


Figure 27 : Structure chimique d'un anion phénoxyde.

Les polyphénols peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (superoxyde O_2^\bullet , radical hydroxyle OH^\bullet) pour produire des radicaux phénoxy stables. Ils peuvent agir comme des antioxydants grâce à leur capacité à piéger les radicaux libres (fig.28) ou à complexer les ions métalliques. Malheureusement, certains polyphénols ont également une action pro-oxydante par transfert d'électrons à des ions métalliques (Buggey, 2001).

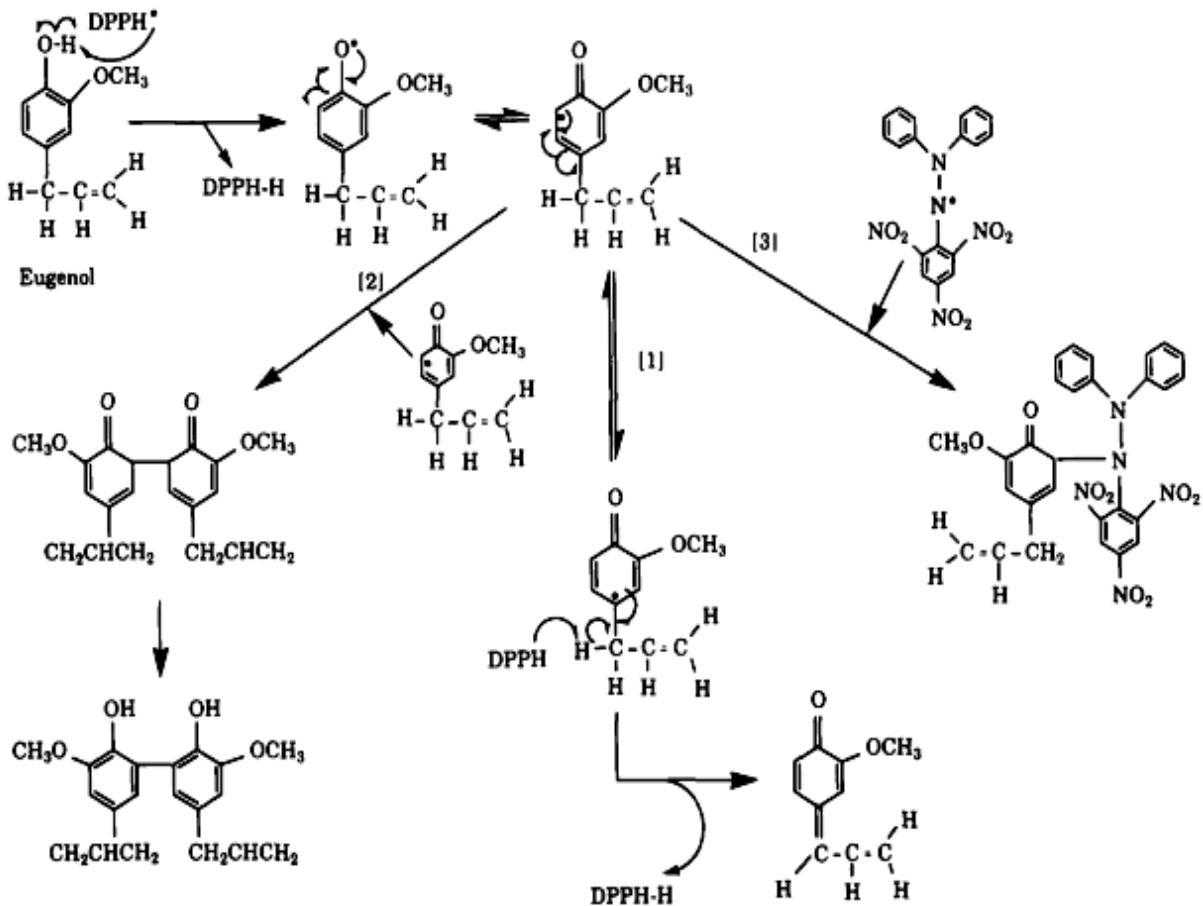


Figure 28 : Réactions potentielles du DPPH avec l'eugénol. Réaction [1]: la donation d'un deuxième atome d'hydrogène; Réaction [2] : dimérisation; Réaction [3] : complexation (Brandwilliams et *al.*, 1995).

Les polyphénols ont une activité antioxydante plus grande que les monophénols. Par exemple, l'acide caféique a une activité antiradicalaire plus grande que l'acide coumarique, son homologue de monophénol, l'acide gallique qui est un triphénol, est plus efficace que l'acide protocatéchique qui est son diphénol. La position du groupe hydroxyle est très importante. Les composés dont le groupe hydroxyle est en position ortho ou para ont une activité plus élevée, que quand il est en position méta. L'efficacité de l'ortho et para des diphénols est due à la stabilisation du radical aryloxy par la liaison hydrogène ou par la régénération d'un autre diphénol (Brand williams et *al.*, 1995) (fig .29).

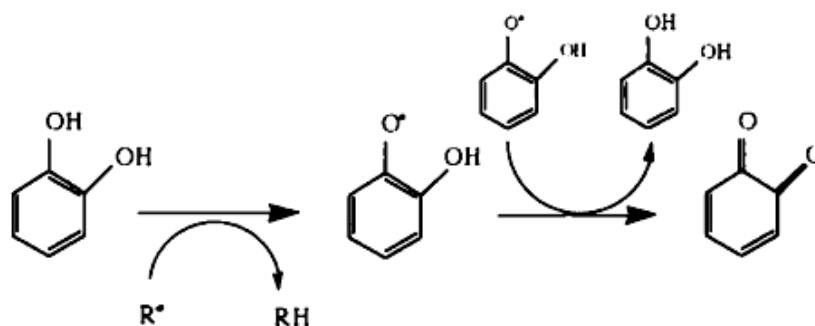


Figure 29 : Mécanisme de la régénération d'un ortho-diphénol (Brand williams et *al.*, 1995).

4.3. Propriétés antifongiques et antibactériennes

Les stilbènes sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés antifongiques. Le trans-resvératrol, par exemple, inhibe la germination de solutions de conidies de *Botrytis cinerea* (Jeandet et *al.*, 2002).

Les gallotannins ont une activité antibactérienne intense vis-à-vis des *Salmonelles* et *Bacillus cereus*. La quercétine et la naringénine présentent une forte activité antibactérienne envers une large gamme de bactéries. La catéchine et l'épicatéchine ne montrent aucune activité antibactérienne exceptée pour *Pseudomas aeruginosa*. A l'inverse, les oligomères P2, P3, P4 ainsi que leurs dérivés gallates sont actifs contre l'ensemble des micro-organismes testés (Collin et *al.*, 2011).

4.4. Impact sur la santé

Les polyphénols jouent un rôle très important sur notre santé et ils ont des activités et rôles différents :

- **Protection cardio-vasculaire** : Les flavonols et les flavonoïdes sont à l'origine d'un effet cardioprotecteur via leurs effets antioxydants (protection contre l'oxydation des LDL), l'inhibition de l'activité plaquettaire et leurs propriétés vasodilatatrices (Prior et *al.*, 2001). L'action protectrice de l'acide gallique serait également due à son action antioxydante (piégeage des radicaux libres) (Priscilla et *al.*, 2009). Le trans-resvératrol agit sur l'agrégation plaquettaire et la vasodilatation. En jouant sur le statut antioxydant, il régule par ailleurs l'expression génétique et mène à une diminution de la concentration totale en lipides (cholestérol et triglycéride) (Delmas et *al.*, 2005).

- **Activité anti-cancérogène** : Le xanthotumol agit sur les trois stades de la cancérogenèse (Collin et *al.*, 2011). Le trans-resvératrol inhibe l'initiation et la croissance des tumeurs (Jang et *al.*, 1999). Les flavonoïdes pourraient réduire le risque de cancer,

bien que certaines activités procarcinogènes aient également été signalées (Collin et *al.*, 2011).

- **Activité anti-inflammatoire :** Les flavonoïdes altèrent la synthèse des eicosanoïdes (médiateurs de l'inflammation). Ils diminuent le rapport leucotriène/prostacycline en modifiant l'activité lipoxycgénasique. Le trans-resvératrol montre des effets similaires (Collin et *al.*, 2011).

- **Activité oestrogénique :** Les prénylflavanones ont surtout été étudiés pour leur activité oestrogénique. L'hopéine est un phyto-œstrogène très puissant. Il est recommandé dans la prévention ou le traitement des symptômes de la (post)ménopause et de l'ostéoporose (Collin et *al.*, 2011). Une activité oestrogénique a récemment été signalée pour certains stilbènes, tel que l'isomère trans du resvératrol (Baur et *al.*, 2006).

4.5. Applications industrielles

Les propriétés ont été exploitées, et trouvent des applications dans de nombreux domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique. Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et des nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (Daglia, 2012).

La capacité antioxydante des polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Ils sont également été préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des produits cosmétiques pour des applications locales (Moure et *al.*, 2001). Enfin, l'effet de certains flavonoïdes en médecine humaine est de plus en plus étudié dans le traitement de certaines maladies et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, principal responsable du SIDA (Sartori-Thiel, 2003).

Les cladodes du figuier de Barbarie sont riches en polyphénols et principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques (El-Mostafa et *al.*, 2014). L'analyse des polyphénols présents dans le jus de cladode et leurs quantifications nous donneront une approche globale sur la composition et la concentration en polyphénols.

Chapitre 4. Production industrielle des jus

La faible consommation de fruits et légumes est associée à l'augmentation des risques de cancers ou autres maladies chroniques. Aux Etats-Unis, une étude datant des années 1994-1996, avant le lancement des campagnes internationales sur le bienfait de la consommation des fruits et légumes, rendait compte de l'état de consommation des Américains. Seulement 29% des jeunes âgés de 2 à 19 ans et 44% des plus de 20 ans consommaient les 5 fruits et légumes quotidiens recommandés (Marsh et *al.*, 2003). Selon l'étude française SU.VI.MAX (2000), la consommation moyenne de fruits et légumes est de 330 g par jour pour les hommes et de 300 g par jour pour les femmes, ce qui correspond à 60% de la population en dessous des recommandations nutritionnelles. Pour pallier cette sous-consommation de fruits et légumes, due entre autres à une faible durée de conservation, aux saisons courtes de consommation, aux prix élevés, le jus de fruits et légumes apparaît être une bonne alternative. D'ailleurs les recommandations nutritionnelles mondiales intègrent clairement le jus de fruits et légumes comme une portion de la consommation quotidienne en fruits et légumes.

1. Définition

Selon la norme générale codex pour les jus et les nectars de fruits (CODEX STAN 247-2005). Le jus de fruits est le liquide non fermenté, mais fermentescible, tiré de la partie comestible de fruits sains, parvenus au degré de maturation approprié et frais ou de fruits conservés dans de saines conditions par des moyens adaptés et/ou par des traitements de surface post-récolte appliqués conformément aux dispositions pertinentes de la Commission du Codex Alimentarius.

Certains jus peuvent être obtenus à partir de fruits comprenant des pépins, graines et peaux qui ne sont pas habituellement incorporés dans le jus, bien que des parties ou composants de pépins, de graines et de peaux impossibles à retirer par des bonnes pratiques de fabrication (BPF) soient acceptés.

Le jus est obtenu par des procédés adaptés qui conservent les caractéristiques physiques, chimiques, organoleptiques et nutritionnelles essentielles des jus du fruit dont il provient. Le jus peut être trouble ou clair et peut contenir des substances aromatiques et des composés volatils restitués, à condition qu'ils proviennent des mêmes espèces de fruits et soient obtenus par des moyens physiques adaptés. De la pulpe et des cellules obtenues par des moyens physiques adaptés à partir du même type de fruits peuvent être ajoutées.

Un jus simple est obtenu à partir d'un seul type de fruit. Un jus mélangé est obtenu en mélangeant deux ou plusieurs jus ou jus et purées obtenus à partir de différents types de fruits.

- **Jus de fruits** : pressé directement par des procédés d'extraction mécaniques.
- **Jus de fruits à base de concentré** : obtenu en reconstituant du jus de fruits concentré, tel que défini avec de l'eau potable.
- **Concentré de jus de fruits** : un concentré de jus de fruits est produit après élimination physique de l'eau en quantité suffisante pour porter la valeur Brix à un niveau supérieur de 50% au moins à la valeur Brix établie pour le jus reconstitué du même fruit. Pour la production du jus destiné à être concentré, des procédés adaptés sont utilisés et peuvent être associés à la diffusion concomitante de cellules ou de pulpe de fruits dans l'eau, à condition que les matières sèches solubles du fruit dont l'eau a été extraite soient ajoutées au jus d'origine avant concentration. Les concentrés de jus de fruits peuvent contenir des substances aromatiques et des composés aromatisants volatils restitués, qui doivent tous être obtenus par des moyens physiques adaptés et provenir du même type de fruit. De la pulpe et des cellules obtenues par des moyens physiques adaptés à partir du même type de fruit peuvent être ajoutées.
- **Jus de fruits obtenu par extraction hydrique** : c'est le produit obtenu par diffusion dans l'eau: du fruit à pulpe entier dont le jus ne peut être extrait par aucun procédé physique ou du fruit entier déshydraté.
- **Purée de fruits destinée à la production de jus et de nectars de fruits** : c'est le produit non fermenté, mais fermentescible, obtenu par des procédés appropriés, par exemple en passant au tamis ou en broyant la partie comestible du fruit entier ou pelé sans en prélever le jus. Le fruit doit être sain, parvenu à un degré de maturation approprié et frais ou bien conservé par des moyens physiques ou par un ou plusieurs des traitements appliqués conformément aux dispositions pertinentes de la Commission du Codex Alimentarius. La purée de fruits peut contenir des substances aromatiques et des composés aromatisant volatils à condition qu'ils aient été obtenus par des moyens physiques adaptés et à partir du même type de fruit. De la pulpe et des cellules obtenues par des moyens physiques adaptés à partir du même type de fruit peuvent être ajoutées.
- **Concentré de purée de fruits destiné à la production de jus et de nectars de fruits** : Le concentré de purée de fruits destiné à la production de jus et de nectars de fruits est obtenu par élimination physique de l'eau de la purée de fruits en quantité suffisante pour accroître la valeur Brix d'au moins 50% par rapport à la valeur Brix établie

pour le jus reconstitué du même fruit. Le concentré de purée de fruits peut contenir des substances aromatiques ou des composés aromatisants volatils restitués, à condition qu'ils aient été obtenus par des moyens physiques adaptés et à partir du même type de fruit.

- **Nectar de fruits** : Le nectar de fruits est le produit non fermenté, mais fermentescible, obtenu en ajoutant de l'eau, avec ou sans adjonction de sucres (sucrose, dextrose anhydre, glucose), de miel et/ou de sirops et/ou d'édulcorants. Des substances aromatiques, des composés aromatisant volatils, de la pulpe et des cellules, qui doivent tous avoir été obtenus à partir du même type de fruit et par des moyens physiques adaptés, peuvent être ajoutés. Le mélange de nectars de fruits est le même produit, obtenu à partir de plusieurs types de fruits différents.

2. Extraction

L'extraction du jus est réalisée selon plusieurs méthodes :

- **Pressurage** : consiste en l'expression du jus. Le jus est contenu dans la vacuole de chaque cellule parenchymateuse du tissu comestible des fruits. Chaque cellule est entourée d'une paroi primaire constituée par un gel rigide de pectines, de cellulose et d'hémicelluloses. Pour extraire le jus, il faut ainsi désorganiser les tissus pour obtenir une pulpe composée de cellules séparées, de fragments de paroi baignant dans le liquide issu des vacuoles. Une fois obtenu, le jus est séparé des particules solides (Drilleau, 1988).

De nombreux paramètres sont à prendre en compte dans le pressurage des fruits et légumes: l'épaisseur de pulpe, sa porosité, sa résistance mécanique, la viscosité, la densité du jus et la pression exercée. La formation d'une couche de râpure, une fois le pressurage effectué, va limiter le drainage. Il est nécessaire de limiter le pressurage trop rapide afin de limiter l'épaisseur de la couche de râpure (Singh and Kulshreshtha, 1996). Actuellement, deux grands types de presses sont utilisés pour le traitement industriel des pulpes de fruits et des légumes: ce sont les presses discontinus, à paquets ou à corbeille, et les presses continus à bandes.

- **Presses discontinus** : Les presses à paquets sont encore utilisés à l'échelle de production artisanale comme par exemple pour le jus de pomme (fig. 30). Ils ont cependant disparu des usines des pays occidentaux en raison de leur faible productivité. Ils permettent d'extraire le jus sur des fruits préalablement broyés ou entiers. Sous l'action de pistons hydrauliques, une force de pression se crée permettant le pressurage

des fruits et légumes situés entre les différents paquets. Ce mode de pressurage est préférablement appliqué aux petites quantités de fruits ou légumes.



Figure 30 : Pressoir à paquet

Les pressoirs à corbeille autorisent le travail de pratiquement tous les types de végétaux. Leur conduite programmable permet d'adapter la pression aux caractéristiques physiques de la matière première de façon à obtenir le meilleur rendement. Le corps du pressoir est constitué d'une corbeille dont le volume peut atteindre 6 m³.

Au niveau du mécanisme de pressurage, la pulpe, introduite dans la corbeille, va subir l'action du piston et sera comprimée contre le tablier (étape 1). Le jus s'écoule au travers des éléments de drainage (étape 2). La rotation du corps du pressoir lors du rebêchage entraîne un malaxage de la pulpe favorisant son contact avec les drains (étape 3). Ceux-ci faisant objet de tamis, le jus obtenu est peu chargé en bourbe. A la fin du pressurage, le piston et la corbeille se retirent, le résidu tombe dans une trémie munie d'une vis d'Archimède (étape 4) (fig.31). Le système, entièrement clos de l'introduction du fruit ou légume jusqu'à la sortie du jus, permet d'assurer une bonne qualité hygiénique du produit.

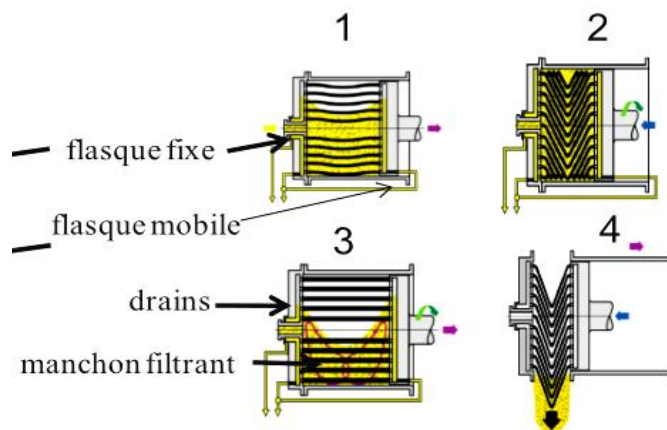


Figure 31 : Principe de fonctionnement d'un pressoir à corbeille.

- **Pressoirs continus** : les pressoirs à bande dérivent des techniques des pressoirs à paquets. Le lit de pulpe (étape 1) est entraîné entre deux toiles sans fin à travers un train de rouleaux et de contre-rouleaux (étapes 2 et 3) dont l'écart en se réduisant exerce une pression progressivement croissante sur la pulpe. Le jus s'écoule à travers la toile inférieure dans un bac collecteur (étape 4). A la fin du dispositif, les toiles s'écartent et permettent le relargage des résidus dans une trémie d'évacuation. Le nettoyage des toiles est assuré par des batteurs et des jets d'aspersion (fig.32).

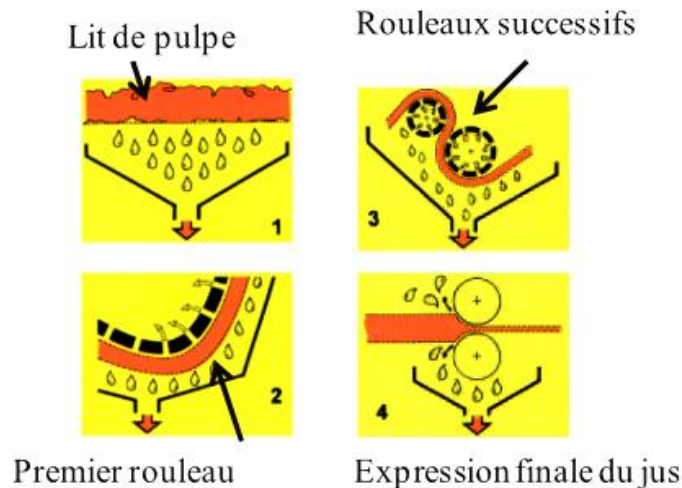


Figure 32 : Schéma explicatif du fonctionnement d'un pressoir à bande.

Dans les agrumes, la présence d'huile essentielle dans l'épiderme interdit le pressurage de la totalité du fruit. La fabrication de jus d'agrumes présente une contrainte qualitative. Les normes imposent une teneur en huile essentielle inférieure à 0,02% en volume du jus final.

3. Traitement thermique

3.1. Généralités

Le traitement thermique des produits implique un chauffage et un refroidissement afin d'avoir un produit avec une longue durée de conservation, qui est exempt d'organismes pathogènes et ne causera pas l'altération des aliments. Le régime de chauffage et de refroidissement est connu sous le nom de processus (Simpson, 2009).

L'opération qui vise l'inactivation des micro-organismes est généralement désignée sous le nom de stérilisation, bien qu'elle ne soit pas la même que les opérations médicales qui nécessitent la suppression complète des espèces microbiennes. Généralement, on a pas besoin d'éliminer les organismes thermophiles qui n'ont aucune importance pour notre

santé ainsi le processus est décrit comme une stérilisation commerciale. Le seul inconvénient est le stockage des produits à une température supérieure à 32 °C, les micro-organismes vont germer et provoqueront la détérioration du produit. Si la température ambiante de stockage dépasse cette température comme dans les pays à climat chaud, il sera alors nécessaire de soumettre le produit à un processus plus sévère (Simpson, 2009).

Le facteur le plus important pour déterminer le processus à suivre est le pH du produit, qui peut varier du neutre avec un pH de 7 à acide avec un pH de 2.8. L'intoxication alimentaire par des micro-organismes comme *Clostridium botulinum* et beaucoup d'autres types de bactéries, les sporulés et les non sporulés sont inhibées à un pH de 4.5 (ou un peu plus élevée $\leq 4,7$). Par conséquent, ce chiffre est souvent considéré comme la ligne de démarcation entre les exigences d'un processus doux à des températures inférieures à 100 °C comme la pasteurisation et un processus plus sévère, souvent connu comme un processus botulique impliquant des températures entre 118 °C et 125 °C (Simpson, 2009).

Les produits alimentaires sont identifiés selon quatre groupes en fonction de leur pH :

- **Groupe 1** : les produits à faible acidité ($\text{pH} \geq 5,0$) – les produits à base de viande, les produits de la mer, le lait, les soupes et la plupart des légumes.
- **Groupe 2** : les produits à acidité moyenne ($\text{pH} 4,5 - 5,0$) – la viande, les légumes, les pâtes, les soupes et les poires.
- **Groupe 3** : les produits acides ($\text{pH} 4,5 - 3,7$) – les tomates, les poires, les figues, l'ananas et d'autres fruits.
- **Groupe 4** : Les produits à haute acidité ($\text{pH} \leq 3,7$) - le pamplemousse, les agrumes et les jus de fruits.

La majeure partie des produits alimentaires nécessitent un procédé de stérilisation, comme la viande, le poisson et les légumes. Par contre, d'autres produits qui viennent sur les lignes séparatrices comme les tomates et les poires dépendent de la variété et de la maturité. Pour les produits de cette région du pH, il est nécessaire de procéder à des essais approfondis pour assurer que l'intoxication alimentaire par les organismes est négative. De même pour les produits formulés, il est nécessaire d'examiner les effets inhibiteurs des ingrédients. Un autre facteur qui doit être pris en compte est la charge microbienne initiale du produit. Il peut être contrôlé en faisant attention aux procédures de manipulation, préparation et les conditions d'hygiène. En parallèle avec le traitement

thermique, il est important de prendre en considération la destruction des éléments nutritifs, la perte en vitamines et la détérioration de la qualité globale. Il est nécessaire de déterminer le processus optimal qui offre les conditions de stérilisation nécessaires et de minimiser la dégradation de la qualité des nutriments (Simpson, 2009).

3.2. Pasteurisation

Les premiers travaux sur la pasteurisation ont été réalisés en 1765 par Spallanzani. Il a utilisé un traitement thermique pour retarder la détérioration et préserver la viande. De 1862 à 1864, Pasteur a montré qu'avec un réchauffement à des températures entre 50 °C et 60 °C pendant des courtes périodes empêchent l'altération du vin par les micro-organismes (Simpson, 2009). Le mot «pasteurisation» a prit son origine dans le travail du chercheur français Louis Pasteur, et se réfère à un traitement doux (50 °C - 90 °C) utilisé pour la conservation qui vise à détruire les formes végétatives des micro-organismes pathogènes ou d'altération (Lund, 1975).

En 2006, la pasteurisation a été récemment redéfinie par le ministère américain de l'Agriculture comme « tout procédé, traitement, ou leur combinaison, qui s'applique aux aliments pour réduire les micro-organismes les plus résistants, à un niveau qui n'est pas susceptible de présenter un risque pour la santé publique dans des conditions normales de distribution et de stockage ». Cette définition inclut donc les processus de pasteurisation non thermiques tels que la haute pression (HP). Le traitement thermique qui nécessite l'application de la chaleur aux aliments est la plus ancienne méthode de pasteurisation. Plus récemment, les effets de la pasteurisation non thermique, comme la forte intensité des champs électriques pulsés et la haute pression sur les micro-organismes et les aliments, ont été étudiés (Simpson, 2009).

De nos jours, la pasteurisation reste en elle-même un but (destruction partiel des micro-organismes) et les techniques sont multiples :

- **Traitement thermique** : L'utilisation de traitements thermiques est de nos jours l'un des principaux moyens de décontamination des produits alimentaires et les efforts d'amélioration vont dans le sens d'une minimisation des modifications des propriétés organoleptiques des produits. Le transfert de chaleur est réalisé par : rayonnement (infrarouge, micro-onde), tubes à passage direct de courant et par chauffage ohmique.

- **Traitement non thermique** : il existe plusieurs techniques qui ciblent la cellule en elle-même et sa destruction à savoir : le champ électrique pulsé, les champs

magnétiques pulsés, les hautes pressions hydrostatiques, la lumière pulsée, les ultrasons et les plasmas froids. Il existe des exceptions sur certains aliments transformés qui contiennent des composants ou des ingrédients qui sont antimicrobiens sous certaines conditions qui inhibent la croissance microbienne: les aliments fermentés contenant de l'alcool ou de l'acide (vin, bière, cornichons), les boissons gazeuses (soda), les aliments très sucrés présentant un $a_w < 0,65$ ou les solides solubles > 70 °Brix (miel, confitures, gelées, fruits secs, concentrés de fruits), ou les aliments salés (poisson ou viande salé). Les autres exceptions concernent les aliments très acides ($\text{pH} < 4,6$) qui sont stables dans les conditions ambiantes après un processus de pasteurisation, car l'environnement acide de ces aliments est défavorable à la croissance des micro-organismes nuisibles et les spores microbiennes dans les aliments pasteurisés. Pour ce type d'aliments ($\text{pH} < 4,6$), un processus de pasteurisation permet d'avoir une durée de vie longue (plusieurs mois) à température ambiante (Ramaswamy et Abbatemarco, 1996), par contre, si le stockage utilisé est réfrigéré, une pasteurisation moyenne peut être appliquée et la qualité des produits est alors améliorée. Pour les aliments à faible acidité ($\text{pH} > 4,6$), la durée de vie est plus courte (quelques jours) est obtenu après la pasteurisation, mais le stockage réfrigéré est nécessaire pour maintenir la sécurité des produits au cours du stockage, en limitant la croissance des survivants pathogènes dans les aliments (Adams et Moss, 1995).

4. Conditionnement

Le jus pasteurisé est conditionné en emballage individuel sous azote (produit fini), ou bien en vrac : fûts (aseptiques ou congelés), bins (emballages aseptiques de 1000 litres), cuves, citernes... Les jus en vrac seront livrés aux élaborateurs de produits finis qui effectuent le conditionnement final, suite à une re-pasteurisation du jus (Baron, 2002).

Conclusion

Le figuier de Barbarie est originaire des plateaux du Mexique qui sont caractérisés par un climat chaud et sec. Il appartient à la famille des cactées et plus précisément au genre *Opuntia*. Les cladodes du figuier de Barbarie sont riches en minéraux, glucides, acide ascorbique, polyphénols et en fibres. Elles contiennent des composants bioactifs qui ont des effets bénéfiques sur notre santé. Elles luttent contre plusieurs maladies qui sont très fréquentes comme l'hyperglycémie et la réduction du cholestérol. Les antioxydants naturels jouent un rôle important dans la régulation du stress oxydatif et participent à l'élimination des radicaux libres qui causent de nombreuses maladies. Ainsi, l'analyse du jus extrait à partir des cladodes donnera une nouvelle valorisation de cette plante qui a été longtemps utilisée durant des siècles et qui est sous-exploitée au Maroc. Il est nécessaire de le mettre en valeur en déterminant sa composition, son activité antioxydante et sa stabilité à savoir la pasteurisation et le temps de stockage.

2^{EME} PARTIE : MATERIEL ET METHODES

Chapitre 1. Matériel végétal

1. Zone d'échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé dans la commune rurale d'Ouled Dlim qui se trouve dans le Cercle Sidi Youssef Ben Ali, Wilaya de Marrakech, Maroc. Elle s'étend sur une superficie de 52400 ha, une altitude de 538 m et se situe à une trentaine de kilomètres au Nord-Ouest de la ville de Marrakech sur la route principale N°9 liant Marrakech à El Jadida (fig.33).



Figure 33 : Localisation du centre d'Ouled Dlim dans la carte du Maroc.

La zone d'échantillonnage se trouve à 6km au Nord-Ouest du centre d'Ouled Dlim sur la partie gauche de la route allant du centre d'Ouled Dlim vers Sidi Bennour (fig.34).



Figure 34: Photo satellite de la zone d'échantillonnage.

2. Conditions climatiques

La région se caractérise par un climat aride où les précipitations sont irrégulières. Sur une moyenne de 30 ans, les précipitations varient de 0 mm au mois d'août et 28.4 mm en janvier (fig.35). Les précipitations annuelles ont changé durant les 30 dernières années (min : 100 mm /an, max : 364,5 mm/an) avec une moyenne de 199,7 mm/an (Rapport de la Direction Provinciale d'Agriculture de Marrakech, 2012).

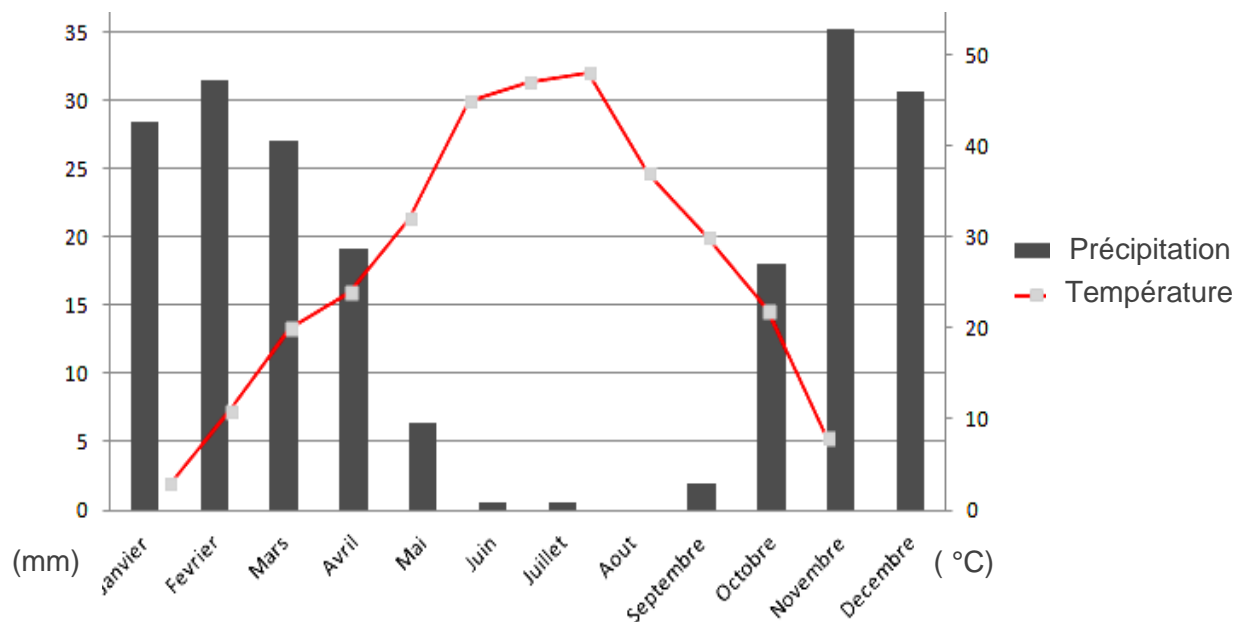


Figure 35: Moyenne annuelle de la pluviométrie et de la température de la région d'Ouled Dlim.

Les températures varient entre 48 °C comme maximum et 3 °C comme minimum, d'où une amplitude très importante. La température augmente durant l'été par les vents de

chergui (vents provenant de l'Est et du Sud-ouest à partir du mois de mai) qui durent en moyenne 39 jours par an (Rapport de la Direction Provinciale d'Agriculture de Marrakech, 2012).

3. Types de sols

La région d'Ouled Dlim fait partie du massif des Jbilet formé généralement par des schistes. Ce type de roche donne des sols peu évolués (Hrach, Hamri, Tirs, Biad) (tabl.8) (Rapport de la Direction Provinciale d'Agriculture de Marrakech, 2012).

Tableau 8 : Différents types de sols de la région d'Ouled Dlim

Types de sols	Hectares	%
Hrach	19,738	15,84
Hamri	56,057	44,99
Tirs	34,541	27,72
Biad	14,264	11,45
Total	124,600	100

4. Echantillonnage

Les deux espèces *Opuntia ficus-indica* (inermes) et *Opuntia megacantha* (épineuse) ont fait l'objet de l'étude. Les deux espèces font la clôture d'une plantation d'olivier et elles ont été plantées en l'an 2000 (fig.36). La pluie est la seule source d'eau pour ces plantes et elles ne reçoivent aucun traitement chimique.



Figure 36 : Photos des deux espèces étudiées et prélevées dans la commune rurale d'Ouled Dlim située au Nord-Ouest de Marrakech au Maroc, (a): *Opuntia ficus-indica* et (b): *Opuntia megacantha*,

Les prélèvements des cladodes ont été réalisés durant trois saisons : printemps (mars), été (août) et hiver (janvier). Les lots de cladodes ont été prélevés aléatoirement. Les dimensions des cladodes ont été choisies selon les mesures suivantes : la longueur entre 15 et 25 cm et la largeur entre 9 et 13 cm (fig.37). Elles correspondent aux dimensions de la référence « napolitos », c'est le nom donné à ce genre de cladodes au Mexique où elles sont largement consommées et commercialisées. Elles sont âgées selon ces dimensions de 3 à 8 mois.

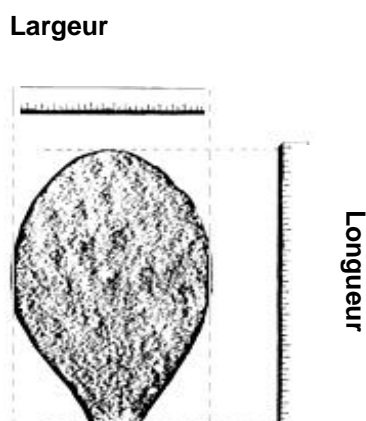


Figure 37 : Dimensionnement des cladodes

Elles présentent sur le plan nutritionnel un optimum de qualité. Elles sont riches en vitamines, polyphénols, fibres, sucres totaux et sucres réducteurs. Elles sont par ailleurs moins fibreuses pour être appréciées par le consommateur, plus tendre et agréable à la bouche avec leur goût acidulé (fig.38) (Hadj Sadok et *al.*, 2008).

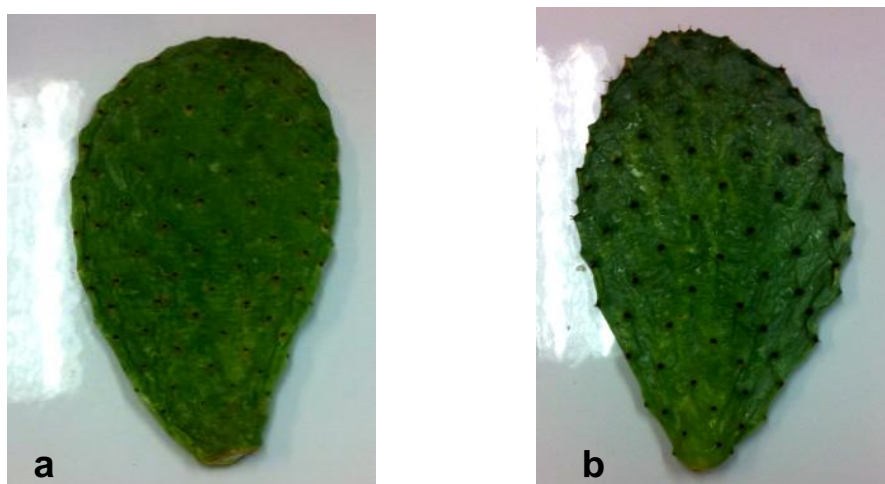


Figure 38 : Cladodes des deux espèces du figuier de Barbarie, (a) : *Opuntia ficus-indica* (inermes) et (b) : *Opuntia megacantha* (épineuse) épines enlevées.

Les lots de cladodes ont été conservés à une température de 4 °C durant une semaine avant analyse.

Chapitre 2 : Extraction du jus

L'extraction du jus à partir des cladodes des deux espèces a été réalisée dans le laboratoire GRAPPE après chaque récolte durant les trois saisons en 2013 -2014.

Les cladodes des deux espèces ont été bien lavées et les épines ont été enlevées par des ciseaux à partir des cladodes épineuses, ensuite le tout a été découpé en cubes de 2 cm et soumis à un broyage à 10 000 tr/min pendant 20s. La purée obtenue a été centrifugée à 15000 tr/min à 4 °C pendant 20 min et le surnageant a été récupéré (fig.39). Les jus clarifiés obtenus des deux espèces ont été stockés à -20 °C avant analyses.

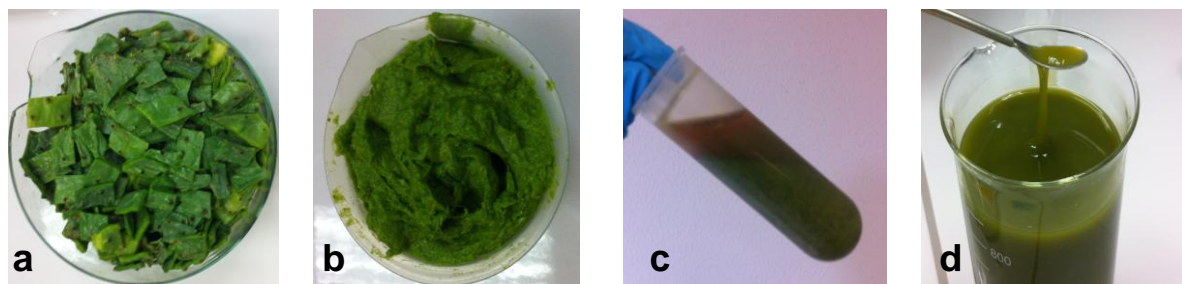


Figure 39: Etapes de l'extraction du jus à partir des cladodes des deux espèces, (a): découpage, (b): broyage, (c): centrifugation et (d): surnageant (jus).

Chapitre 3. Analyses physico-chimiques et biochimiques

1. Analyses physico-chimiques de base

Les analyses physico-chimiques ont été réalisées au laboratoire GRAPPE à Angers sur les jus extraits des cladodes après décongélation.

1.1. Teneur en eau

La teneur en eau a été déterminée par dessiccation des échantillons (2g) dans une étuve ventilée à une température de 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant (AFNOR NF V03-40).

1.2. Teneur en cendre

La teneur en cendre a été déterminée par minéralisation de la matière sèche à 550 °C pendant 3 heures (AFNOR NF V03-40).

1.3. pH

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre (S20 SevenEasy, Mettler Toledo).

1.4. Acidité titrable

L'acidité titrable a été mesurée par titrage de 25 mL de jus en présence d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,25 N jusqu'à l'obtention d'un pH de 8,1 (NF-E 12147). Le résultat a été exprimé en g d'acide citrique équivalent par 1L de jus.

1.5. Degrés brix

Le degrés brix a été mesuré à l'aide d'un refractomètre électronique (KYOTO, RA-130).

2. Analyses physico-chimiques et biochimiques

Les analyses physico-chimiques ont été réalisées au laboratoire des bioprocédés et biointerfaces à Beni Mellal en 2014.

2.1. Polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon la méthode de Singleton et *al.* (1999). Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}).

a) Mode opératoire

- *Préparation de la solution Folin-Ciocalteu*
 - Diluer le réactif de Folin-Ciocalteu à 1:10 avec de l'eau distillée.
 - Préparer une solution de carbonate de sodium 60g / L.
- *Préparation des échantillons*
 - Préparer une concentration de 1 :10 (g/g) de jus dans du méthanol (une précipitation observée est due aux pectines).
 - Centrifuger pendant 20 min à 15 000 tr/min à 4 °C et récupérer le surnageant.
- *Préparation de la gamme étalon de l'acide gallique*
 - Préparer une gamme d'étalonnage de l'acide gallique allant de 10 à 500 μ M dans du méthanol.

b) Réaction et lecture au spectrophotomètre

La mesure des polyphénols totaux des solutions se fait par mesure de l'absorbance de la solution à 725 nm après 30 minutes de réaction avec un spectrophotomètre

(Spectrophysique Jasco double faisceau) et des gammes d'étalonnage de l'acide gallique à $t = 6$ min.

- Dans une cuve en plastique, déposer 1,5 mL de la solution de Folin-Ciocalteu diluée + 0,2 mL de chaque extrait de jus ou d'acide gallique.
- Laisser le mélange reposer pendant 5 min ensuite ajouter 1,5 mL de carbonate de sodium.
- Préparer le blanc : 1,5 mL de la solution Folin diluée + 0,2 mL de méthanol + 1,5 ml de carbonate de sodium.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 725 nm.
- Répéter l'analyse 3 fois.

c) Expression des résultats

Pour exprimer les résultats obtenus, on utilise le pourcentage d'inhibition qui correspond à la réduction du réactif Folin-Ciocalteu par les polyphénols présents dans les échantillons testés.

$$\% \text{ Folin-Ciocalteu réduit} = \frac{A_{\text{échantillon}} - A_{\text{blanc}}}{A_{\text{échantillon}}} \times 100$$

où : A_{blanc} est l'absorbance du blanc et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de l'échantillon ou de l'acide gallique.

A partir des pourcentages d'inhibition à différentes concentrations d'acide gallique nous pouvons tracer la droite de régression linéaire (coefficient de régression proche de 1). On en déduit l'équation de la droite qui exprime la concentration massique de l'acide gallique en fonction du pourcentage d'inhibition.

Les pourcentages d'inhibitions des jus sont ensuite remplacés dans l'équation de la droite de régression et nous pouvons ainsi obtenir notre dosage de polyphénols en μg EAG (Equivalent Acide Gallique) / mL.

2.2. Protéines totaux

La teneur en protéines totaux a été réalisée par la méthode de Lowry et *al.* (1951). En milieu alcalin, il y'a une fixation d'ions Cu^{2+} par chélation (Cu^{2+} est stabilisé par du tartrate) sur les protéines et une réaction de réduction de Cu^{2+} en Cu^+ . La mise en présence du milieu avec le réactif de Folin-Ciocalteu (acide phosphomolybdo-tungstique) en présence de protéines et de Cu^+ , en milieu acide, entraîne (par les aminoacides

tryptophane, tyrosine, cystéine, cystine ...) la réduction du réactif de Folin en espèces moléculaires réduites colorées en bleu (longueur d'onde maximum entre 745 et 750 nm).

a) Mode opératoire

- *Préparation de la solution de prétraitement cupro-alkalin*

Peser 20g d'hydroxyde de sodium, 100g de carbonate de sodium, 2g de tartrate de potassium et de sodium et 0,5 g de sulfate de cuivre II pentahydraté et compléter par 1000 mL d'eau distillée.

- *Préparation des échantillons*

Préparer une dilution du jus à 1:20 avec de l'eau distillée.

- *Préparations de la gamme étalon du Serum Albumin Bovine*

Préparer une gamme d'étalonnage allant de 1 à 20 mg/100 mL du Serum Albumin Bovine dans de l'eau distillée.

b) Réaction et lecture au spectrophotomètre

La mesure des protéines des solutions se fait par mesure de l'absorbance de la solution à 750 nm avec un spectrophotomètre (Spectrophysique Jasco double faisceau).

- Dans une cuve, déposer 1 mL de l'échantillon dilué ou du SAB + 1 mL de la solution de prétraitement. Laisser le mélange reposer pendant 10 min à température ambiante ensuite ajouter 4 mL du réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 1:8 avec de l'eau distillée.
- Préparer le blanc : 1 mL d'eau distillée + 1 mL de la solution de prétraitement + 4 mL de la solution de Folin-Ciocalteu diluée à 1:8.
- La solution est incubée pendant 5 min à 55 ± 1 °C, ensuite elle est refroidie dans de l'eau froide pendant 30 min.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 750 nm.
- Répéter l'analyse 3 fois.

c) Expression des résultats

Le changement de l'absorbance entre la lecture de l'échantillon et la lecture du blanc a été calculé pour chaque échantillon. Les résultats sont obtenus selon la courbe d'étalonnage du Serum Albumin Bovin et ils sont exprimés en mg ESAB (Equivalent Serum Albumin Bovin) /mL.

2.3. Tanins condensés

Ce dosage a été réalisé selon la méthode colorimétrique de Joslyn (1970). Il est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique en milieu alcalin, en présence de tanins pour donner une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à 760 nm.

a) Mode opératoire

- *Préparation des échantillons*

Préparer un jus dilué à 1:10 avec un mélange eau-méthanol (2:3).

- *Préparations de la gamme étalon de l'acide tannique*

Préparer une gamme d'étalonnage de l'acide tannique allant de 100 à 1000 mg/L.

b) Réaction et lecture au spectrophotomètre

La mesure des tanins condensés dans les jus se fait par mesure de l'absorbance de la solution à 760 nm avec un spectrophotomètre (Spectraphysique Jasco double faisceau).

- Dans une cuve, déposer 0,5 mL du jus dilué ou de l'acide tannique + 2,5 mL de la solution de Folin-Ciocalteu + 5 mL de carbonate de sodium à 7,5 %.
- Laisser le mélange reposer pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité.
- La solution est incubée pendant 5 min à 55 ± 1 °C, ensuite elle est refroidie dans de l'eau froide pendant 30 min.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 760 nm.
- Répéter l'analyse 3 fois.

d) Expression des résultats

Le changement de l'absorbance entre la lecture de l'échantillon et la lecture du blanc a été calculé pour chaque échantillon. Les résultats sont exprimés selon la courbe d'étalonnage de l'acide tannique et ils sont exprimés en mg EAT (Equivalent Acide Tannique) / mL.

2.4. Tanins hydrosolubles

Les tanins hydrosolubles sont déterminés par la méthode de Willis et Allen (1998).

a) Mode opératoire

- *Préparation des échantillons*

Préparer un jus dilué à 1:10 avec un mélange eau-méthanol (2:3).

- *Préparations de la gamme étalon de l'acide tannique*

Préparer une gamme d'étalonnage de l'acide tannique allant de 100 à 1000 mg/L.

b) Réaction et lecture au spectrophotomètre

La mesure des tanins hydrosolubles des solutions se fait par mesure de l'absorbance de la solution à 550 nm avec un spectrophotomètre (Spectraphysique Jasco double faisceau).

- Dans une cuve, déposer 0,5 mL du jus dilué ou de l'acide tannique + 2,5 mL de la solution d'iodate de potassium à 2,5%.
- Laisser le mélange reposer pendant 4 min à température ambiante dans l'obscurité.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 550 nm.
- Répéter l'analyse trois fois.

c) Expression des résultats

Le changement de l'absorbance entre la lecture de l'échantillon et la lecture du blanc a été calculé pour chaque échantillon. Les résultats sont exprimés selon la courbe d'étalonnage de l'acide tannique et ils sont exprimés en mg EAT (Equivalent Acide Tannique) / mL.

2.5. Flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes est déterminée selon la méthode de Lamaison et Carnat (1990). Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe d'aluminium-flavonoïde, ayant une absorption maximale à 430 nm.

a) Mode opératoire

- *Préparation des échantillons*

Préparer un jus dilué à 1:100 avec un mélange eau-méthanol (2:3)

- *Préparations de la gamme étalon de la rutine*

Préparer une gamme d'étalonnage de la rutine allant de 100 à 1000 mg/L.

b) Réaction et lecture au spectrophotomètre

La mesure des flavonoïdes dans les jus se fait par mesure de l'absorbance de la solution à 430 nm avec un spectrophotomètre (Spectraphysique Jasco double faisceau).

- Dans une cuve, déposer 1 mL de jus dilué ou de la rutine + 1 mL de chlorure d'aluminium à 2 %.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 430 nm.
- Répéter l'analyse trois fois.

- **Expression des résultats**

Le changement de l'absorbance entre la lecture de l'échantillon et la lecture du blanc a été calculé pour chaque échantillon. Les résultats sont obtenus selon la courbe d'étalonnage de la rutine et ils sont exprimés en mg ER (Equivalent Rutine) /mL.

2.6. Sucres

Le dosage des sucres a été déterminé selon la méthode de Dubois (1965). Cette méthode permet de doser les oses en utilisant le phénol et l'acide sulfurique concentré. En présence de ces deux réactifs, les oses donnent une couleur jaune-orange dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides, la densité optique est déterminée entre 450 à 550 nm

a) Mode opératoire

Préparer une gamme d'étalonnage du glucose allant de 100 à 1000 mg/L.

b) Réaction et lecture au spectrophotomètre

La mesure des sucres dans les jus se fait par mesure de l'absorbance de la solution à 490 nm avec un spectrophotomètre (Spectraphysique Jasco double faisceau).

- Dans une cuve, déposer 1 mL de jus ou de glucose + 1 mL de phenol 10% + 5mL d'acide sulfurique concentré.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 490 nm.
- Répéter 3 fois l'analyse.

c) Expression des résultats

Le changement de l'absorbance entre la lecture de l'échantillon et la lecture du blanc a été calculé pour chaque échantillon. Les résultats sont obtenus selon la courbe d'étalonnage du glucose et ils sont exprimés en mg EG (Equivalent Glucose) /mL.

2.7. Dosage des pectines

Le dosage des pectines a été réalisé selon la méthode de Nilesh et *al.* (2014). Un volume de 2 mL de jus est mélangée avec 6 mL d'éthanol à 80% dans un milieu acide (pH =1,5). Ensuite le mélange est soumis à une centrifugation (8000 tr/min, 15 min) et le culot récupéré est mis en étuve à 50 °C. Ainsi, le pourcentage de pectine dans le jus est calculé par une différence de masses.

2.8. Acide ascorbique

L'acide ascorbique est dosé directement par iodométrie (NF ISO 3961 9-96). L'acide ascorbique est oxydé par une solution de diiode en excès. Le diiode restant est dosé par une solution de thiosulfate de sodium. La solution d'analyse est composée de 5 mL de jus, 5 mL d'une solution de diiode (I_2) à une concentration de 0,005 M et quelques gouttes de l'empois d'amidon. Un titrage est réalisé avec l'ajout du thiosulfate de sodium (0,005 M) jusqu'à disparition de la couleur foncée. La concentration d'acide ascorbique du jus est calculée comme suit : soustraire au nombre de moles de diiode de départ celles qui ont réagi avec le thiosulfate.

2.9. Minéraux

Les minéraux quantifiés dans les jus de cladodes des deux espèces durant les trois saisons sont les macroéléments suivants: calcium (Ca), potassium (K), magnésium (Mg) et le sodium (Na). L'analyse a été effectuée au C.N.R.S.T.(Centre Nationale de Recherche Scientifique et Technique) à Rabat en 2014 par spectrométrie d'émission atomique ICP (AES Ultima 2-Jobin Yvon).

3. Identification des acides organiques par HPLC / MS

L'identification qualitative des acides organiques a été déterminée par HPLC/MS au C.N.R.S.T. à Rabat en 2015. Le chromatographe en phase liquide est couplé au spectromètre de masse LC/MS qui est composé d'un HPLC de type LC Surveyor de marque thermo-électron équipé d'une pompe quaternaire basse pression avec un dégazeur intégré. Elle permet de travailler en mode isocratique et gradient. Le Détecteur UV à barrettes de diodes SURVEYOR dispose d'une gamme spectrale allant de 190 à 800 nm. Ce détecteur permet l'acquisition automatique des spectres UV-Visible et faire trois chromatographies simultanées à trois longueurs d'ondes différentes. Le détecteur spectromètre de masse LCQ Advantage MAX type trappe d'ions est doté de deux modes d'ionisation : ESI et APCI. L'ionisation des échantillons peut se faire en polarité positive ou négative selon une grande sensibilité et une bonne résolution et précision en masse (50-2000). Le système intègre une pousse seringue et une vanne d'injection/dérivation ce qui permet l'introduction direct de l'échantillon dans le spectromètre de masse.

Les conditions chromatographiques ont été réalisées selon la méthode de Shui et leong (2002). Une séparation optimale a été obtenue en utilisant une solution d'acide sulfurique (solvant A) à pH 2,5 avec un débit de 0,35 mL /min et du méthanol (solvant B) avec un débit allant de 0 à 0,45 mL /min de 15 à 75 min et qui est maintenu à 0,45 mL /min

pendant une durée de 5 min, puis ramené aux conditions initiales durant 5 min. Dix minutes d'équilibration est nécessaire avant l'injection suivante. D'autres paramètres retenus ont été les suivants: volume d'injection 20 µL, colonne de type BDS C18 (150 x 4,6 mm x 5µm), température de la conne 40 °C, longueur d'onde de détection 215 nm. Les standards utilisés pour l'analyse qualitative sont : acide oxalique, acide citrique, acide ascorbique et acide tartrique.

4. Identification des polyphénols par HPLC

L'identification des polyphénols du jus de cladode a été déterminée par analyse HPLC au laboratoire GRAPPE à Angers en 2013. Le jus a été dilué à 50% dans du méthanol, puis centrifugé à 15 000 tr/min pendant 20 min. Le surnageant a été filtré à travers un filtre de 0,45 µm pour les analyses. Les acides phénoliques et le profil des flavonoïdes du jus de cladode a été déterminé en utilisant un appareil n dans système gradient (éluant A = eau / acide formique, 95: 5, v / v; éluant B = / eau / acide formique / acétonitrile, 80: 15: 5, v / v / v). Le gradient de l'éluant utilisé était le suivant: 0-19 min, 3-4% de B ; 19 à 30 min, 4% de B; 30-31 min, 4-6% B; 31-38 min, 6-14% de B; 38-50 min, 14% de B; 50-55 min, 14-30% de B; 55-65 min, 30 à 35% de B; 65-68 min, 35 à 50% de B; 68-70 min, 50-80% de B; 70-75 min, 80% de B; 75-80 min, 80-3% B; 80 à 90 min 3%. Le volume d'injection est de 10 µL avec un débit de 1 mL /min. Les composés ont été identifiés par comparaison avec les standards des composés phénoliques en utilisant le temps de rétention et les spectres U.V. Les acides phénoliques et les flavonoïdes ont été identifiés à partir d'une courbe de calibration correspondant aux standards. Les résultats sont exprimés en microgrammes par millilitre (µg / mL).

5. Activité antioxydante et antiradicalaire in vitro

La détermination de l'activité antioxydante et antiradicalaire a été effectuée au laboratoire GRAPPE à Angers en 2013-2014. Il existe plusieurs méthodes chimiques pour le dosage in vitro de l'activité antioxydante (antioxydants exogènes). Les trois méthodes réalisées sont: test FRAP (Activité antioxydante) et les deux tests DPPH et ABTS (activité antiradicalaire).

5.1. Piégeage des radicaux libres par le test DPPH

La mesure de l'activité antiradicalaire par le radical libre DPPH^{*} a été réalisée selon la méthode de Brand-Williams et *al.* (1995).

a) Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation entre la structure et l'activité antiradicalaire des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (fig.40). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et le DPPH[•] reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur pourpre bien caractéristique de la solution de DPPH[•]. La mesure de l'activité antiradicalaire est réalisée par résonance paramagnétique électronique (RPE) ou par mesure de la diminution de son absorbance. La plus utilisée est le test de décoloration qui a été signalée par Brand-Williams et ses collaborateurs en 1995. Ainsi, la mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration pourpre, due à une recombinaison des radicaux DPPH[•], mesurable par spectrophotométrie (Brand-williams et *al.*, 1995).

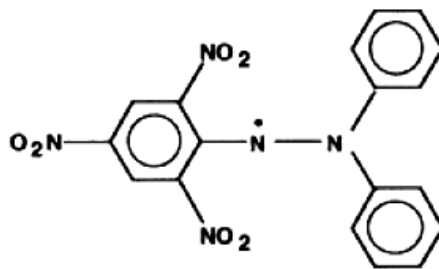


Figure 40 : Structure chimique du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).

Le piégeage des radicaux libres par les antioxydants est réalisé par deux types de mécanismes: la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certains acides et dérivés phénoliques) et la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) (Huang et *al.*, 2005). Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert du proton H^+ sur le DPPH[•] alors transformé en une molécule stable DPPHH (fig.41) (Molyneux, 2004).



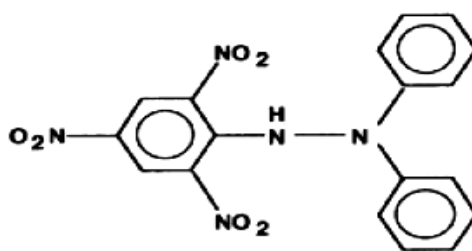
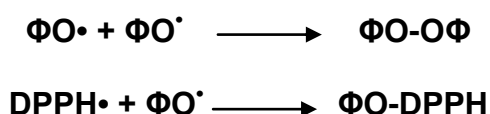


Figure 41 : Structure chimique du non radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine).

Plusieurs voies réactionnelles sont alors possibles. Elles forment des structures plus au moins stables :



La capacité antioxydante (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport antioxydant / DPPH[•], type de solvants et pH) et en particulier le profil phénolique (Molyneux, 2004).

Le pourcentage de DPPH restante est calculé comme étant :

$$\% DPPH \cdot_{REST} = 100 \times [DPPH \cdot]_{REST} / [DPPH \cdot]_{T=0}$$

Le pourcentage restant de DPPH[•] (DPPH[•]_{REST}) est proportionnel à la concentration en antioxydant, et la concentration qui provoque une diminution de la concentration initiale DPPH[•] de 50% est définie comme étant la EC₅₀. Le temps nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre avec la EC₅₀ est défini comme étant la T_{EC50}. Un autre paramètre a été introduit pour exprimer la capacité antioxydante appelée : efficacité antiradicalaire (EA). Elle a été définie comme suit (Sanchez-Moreno et al., 1998):

$$EA = 1 / EC_{50} T_{EC50}$$

Le test DPPH est considéré comme étant fondé principalement sur des réactions de transfert d'électrons, par contre les réactions de transfert d'atomes d'hydrogène sont marginales (Ou et al., 2005).

b) Mode opératoire

- Préparation de la solution DPPH

- Préparer une solution de DPPH de 60 µmol dans du méthanol. La mettre sous agitation pendant 30 minutes dans l'obscurité.
- La couleur initiale de cette solution est violet foncé. Elle doit être conservée dans l'obscurité.

Les solutions de DPPH se conservent mal, ne dépassant pas 24h. Il est donc nécessaire d'utiliser dans la journée la solution préparée.

- *Préparation des échantillons*
 - Préparer une concentration de 1 :10 (g/g) de jus dans du méthanol (une précipitation est due aux pectines).
 - Centrifuger pendant 20 min à 15 000 tr/min à 4 °C et récupérer le surnageant.
- *Préparation de la solution étalon de Trolox*
Préparer une gamme d'étalonnage de la solution de Trolox allant de 10 à 500 µM dans du méthanol.

c) Réaction et lecture au spectrophotomètre

La mesure de l'activité antioxydante du jus de cladode se fait par mesure de l'absorbance du radical DPPH^{*} à 515 nm après 8h de réaction avec un spectrophotomètre (Onde de puissance XS Bioteck) et pour les solutions de Trolox à t= 6min.

- Dans une cuve, déposer 3,9 mL de la solution de DPPH + 0,1 mL de chaque extrait de jus ou de Trolox.
- Préparer le blanc : 3,9 mL de DPPH + 0,1 mL de méthanol.
- Isoler ces cuves dans l'obscurité et lire l'absorbance au spectrophotomètre à 515 nm.
- Répéter l'analyse 3 fois.

d) Expression des résultats

Pour exprimer les résultats obtenus, on utilise le pourcentage d'inhibition qui correspond au pourcentage de DPPH^{*} qui a été inhibé par les antioxydants présents dans les échantillons testés.

$$\% \text{ DPPH}^* \text{ inhibé} = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100$$

Où : A_{blanc} est l'absorbance du blanc et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de l'échantillon ou du Trolox.

A partir des pourcentages d'inhibition à différentes concentrations du Trolox nous pouvons tracer la droite de régression linéaire (coefficient de régression proche de 1). On en déduit l'équation de la droite qui exprime la concentration molaire en fonction du pourcentage d'inhibition. Les pourcentages d'inhibitions des jus sont ensuite remplacés dans l'équation de la droite de régression et nous pouvons ainsi obtenir notre activité antioxydante en $\mu\text{mol ET (Equivalent Trolox) / mL}$.

5.2. Piégeage des radicaux libres par le test ABTS

Le test ABTS a été réalisé selon la méthode de Re et *al.* (1999).

a) Principe

Ce test est basé sur la capacité des antioxydants à éliminer le radical anion $\text{ABTS}^{\bullet-}$ (fig.42). Dans ce dosage, l'ABTS est oxydé par les radicaux peroxydes ou d'autres oxydants à sa forme radical cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ qui est intensément coloré et l'activité antioxydante est mesurée comme étant la capacité des composés qui réagissent directement avec le radical l'ABTS $^{\bullet+}$ à diminuer la couleur. Les résultats du test sont exprimés par rapport au Trolox (Miller et *al.*, 1993).

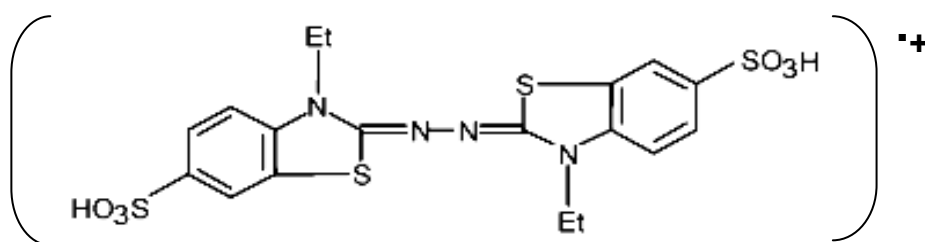


Figure 42 : Structure de l'ABTS $^{\bullet+}$.

L'ABTS $^{\bullet+}$ peut être généré soit par une réaction chimique : le dioxyde de manganèse, ABAP, le persulfate de potassium ou par des réactions enzymatiques : metmyoglobine, l'hémoglobine, ou la peroxydase. En général, la production chimique nécessite une longue durée qui peut aller jusqu'à 16 h pour la production du persulfate de potassium et à haute température (60 °C) pour l'ABAP. Tandis que la génération par des enzymes est plus rapide et les conditions de réaction sont plus simples. La peroxydase de Raifort qui a été utilisée pour générer l'ABTS $^{\bullet+}$ a montré que la réaction peut être étudiée sur une large plage de valeurs de pH (Cano et *al.*, 2002). Cependant, le mécanisme de la réaction peut changer avec le pH et le transfert d'électrons est facilité à un pH acide.

Cette variation a été également adaptée pour sélectionner les antioxydants hydrophiles et lipophiles en exécutant respectivement les essais dans des milieux tamponnés et des solvants organiques. Cependant, les réactions dans l'eau semblent être favorisées (Prior et al., 2005).

Le maximum d'absorption de l'ABTS^{•+} se fait à des longueurs d'onde de 415, 645, 734, et 815 nm. En termes de méthodes de quantification, la plupart des méthodes mesurent la diminution de l'absorbance de l'ABTS^{•+} en présence de l'échantillon d'essai ou du Trolox, puis la capacité antioxydante est calculée en équivalents Trolox (Cano et al., 2000).

b) Mode opératoire

• Préparation de la solution ABTS^{•+}

Une solution ABTS à une concentration de 7 mM est préparée dans de l'eau déminéralisée qu'on mélange avec une solution de persulfate de potassium d'une concentration de 2,45 mM dans de l'eau déminéralisée avec un ratio de 1:0,5.

Laisser reposer à température ambiante dans l'obscurité de 12 à 16 heures.

• Préparation des échantillons

- Préparer une concentration de 1:10 (g/g) de jus dans du méthanol (précipitation due aux pectines)
- Centrifuger pendant 20 min à 15 000 tr/min à 4 °C, et récupérer le surnageant.

• Préparation de la solution étalon de Trolox

Préparer une gamme d'étalonnage de la solution de Trolox allant de 10 à 500 µM dans du méthanol.

c) Réaction et lecture au spectrophotomètre

La mesure de l'activité antiradicalaire se fait par mesure de l'absorbance de la solution ABTS^{•+} à 734 nm après 60 minutes de réaction avec un spectrophotomètre (Power wave XS BIOTECK) et des solutions de Trolox à t = 6 min.

- L'ABTS^{•+} est dilué dans l'éthanol afin d'avoir une absorption de 0,70 (± 0,02) à 734 nm.
- Dans une cuve, déposer 3 mL de la solution ABTS^{•+} + 30 µL de chaque extrait de jus ou de Trolox.
- Préparer le blanc : 3 mL de la solution ABTS^{•+} + 30 µL de méthanol.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 734 nm.
- Répéter l'analyse 3 fois.

d) Expression des résultats

Pour exprimer les résultats obtenus, on utilise le pourcentage d'inhibition qui correspond à la réduction de l'ABTS^{•+} par les antioxydants présents dans les échantillons testés.

$$\% \text{ ABTS}^{\bullet+} \text{ inhibé} = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100$$

Où : A_{blanc} est l'absorbance du blanc et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de l'échantillon ou du Trolox.

A partir des pourcentages d'inhibition à différentes concentrations du Trolox nous pouvons tracer la droite de régression linéaire (coefficient de régression proche de 1). On en déduit l'équation de la droite qui exprime la concentration molaire en fonction du pourcentage d'inhibition. Les pourcentages d'inhibitions des jus sont remplacés dans l'équation de la droite de régression et nous pouvons ainsi obtenir notre activité antioxydante en $\mu\text{mol ET}$ (Equivalent Trolox) /mL.

5.3. Activité antioxydante par le test FRAP

Le dosage du pouvoir antioxydant par la méthode FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) a été fait selon la méthode de Benzie et Strain (1996).

a) Principe

La méthode a été initialement développée par Benzie et Strain en 1996 pour mesurer le pouvoir de réduction dans le plasma, par la suite l'essai été adapté et utilisé pour le dosage des antioxydants botaniques. La réaction mesure la réduction du TPTZ (2,4,6-ferrique tripyridyl-s-triazine) ferreux qui se traduit par un changement de couleur (Benzie et *al.*, 1996) (fig. 43).

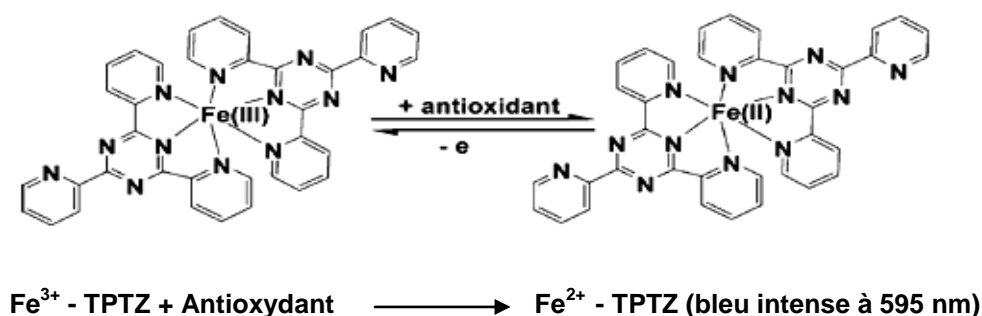


Figure 43 : Réaction FRAP entre Fe^{3+} -TPTZ et l'antioxydant.

Le pouvoir de réduction semble être lié au degré d'hydroxylation et l'étendu des conjugaisons dans les polyphénols (Pulido et *al.*, 2000). Cependant, le test FRAP ne peut pas détecter les composés qui agissent par transfert de protons H^+ , en particulier les thiols et les protéines (Ou et *al.*, 2002). Le mécanisme des réactions FRAP se base totalement sur un transfert électronique plutôt qu'un mélange de transfert d'électrons et de protons. En combinaison avec d'autres méthodes il peut être très utile pour distinguer les mécanismes dominants avec différents antioxydants (Prior et *al.*, 2005).

La réaction repose sur la réduction des ions ferrique Fe^{3+} en ions ferreux Fe^{2+} . En présence d'un pH bas, les complexes ions ferriques - tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) sont réduits sous la forme de complexes ions ferreux - tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) qui développent une couleur bleu intense avec un maximum d'absorption à 593 nm.

b) Mode opératoire

- *Préparation du réactif FRAP*

- Préparation du tampon acétate de sodium à une concentration de 300 mM et $pH=3,6$: peser précisément 3,1g d'acétate de sodium, rajouter 16 mL d'acide acétique et compléter jusqu'à 1000 mL avec de l'eau déminéralisée.
- Préparer une solution d'acide chlorhydrique $C = 40$ mM.
- Préparer une solution de 2.4.6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) $C= 10$ mM dans une solution d'HCl à 40 mM.
- Préparer une solution $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ à une concentration de 20mM.
- Préparation du réactif FRAP : 25 mL de tampon acétate de sodium + 2,5 mL de la solution TPTZ + 2,5 mL de la solution de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$.

- *Préparation des échantillons*

- Préparer une concentration de 1 :10 (g/g) de jus dans du méthanol (précipitation due aux pectines).
- Centrifuger pendant 20 min à 15 000 tr/min à 4 °C, et récupérer le surnageant.

- *Préparation de la solution étalon de Trolox*

- Préparer une gamme d'étalonnage de la solution de Trolox allant de 10 à 500 μM .

c) Réaction et lecture au spectrophotomètre

La mesure de l'activité antioxydante des jus se fait par mesure de l'absorbance de la solution FRAP à 593 nm avec un spectrophotomètre (Power wave XS BIOTECK) après 30 minutes de réaction et des solutions Trolox à $t = 6$ min.

- Dans une cuve, déposer 3 mL de la solution FRAP + 100 µL de chaque extrait de jus ou de Trolox.
- Préparer le blanc : 3 mL de la solution FRAP + 100 µL de méthanol.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 593 nm.
- Répéter l'analyse 3 fois.

d) Expression des résultats

Pour exprimer les résultats obtenus, on utilise le pourcentage d'inhibition qui correspond à la réduction des ions ferrique Fe^{3+} en ions ferreux Fe^{2+} par les antioxydants présents dans les échantillons testés :

$$\% Fe^{3+} \text{ réduit} = \frac{A_{\text{échantillon}} - A_{\text{blanc}}}{A_{\text{échantillon}}} \times 100$$

Où : A_{blanc} est l'absorbance du blanc et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de l'échantillon ou du Trolox.

A partir des pourcentages d'inhibition à différentes concentrations du Trolox nous pouvons tracer la droite de régression linéaire (coefficient de régression proche de 1). On en déduit l'équation de la droite qui exprime la concentration molaire en fonction du pourcentage d'inhibition. Les pourcentages d'inhibitions des jus sont ensuite remplacés dans l'équation de la droite de régression et nous pouvons ainsi obtenir notre activité antioxydante en µmol ET (Equivalent Trolox) / mL.

Chapitre 4. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques sur le jus de cladode obtenu par pressage mécanique et pasteurisation ont été effectuées au laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire à l'université Mohammed V de Rabat et l'analyse microbiologique à été réalisée à l'hôpital CHU Ibn Sina de Rabat. Les micro-organismes ciblés après pasteurisation sont les levures et les moisissures. La concentration acceptable ne doit pas dépasser 10^3 UFC/g ou mL (tabl.9).

D'autres tests microbiologiques ont été rajoutés afin d'assurer le processus de pasteurisation selon le règlement 2073/2005/CE tel que : la flore totale, les coliformes totaux, les coliformes fécaux et les salmonelles.

Tableau 9 : Valeurs maximales tolérées pour les jus non pasteurisés et pasteurisés.

Jus	Microorganismes	Valeurs limites	Application	Références
Pasteurisé	Levures, moisissures	10 ³ UFC/g ou mL	Consommation	Norme Québec 2009
	Levures, moisissures	10 ⁵ UFC/g ou mL	Consommation	La qualité microbiologique des aliments (Jouve J.L.)
Non pasteurisé	E. coli	10 ³	Fabrication	
	Salmonella spp.	Abs/25 g ou mL	Mise sur le marché et durée de vie	Règlement 2073/2005/ CE
	E. coli o157 :H7	Abs/25 g ou mL	Fin DLC	

1. Flore totale

- **Milieu de culture** : La gélose glucosée à l'extrait de levure, appelée par les Anglo-Saxons "Plate Count Agar" ou PCA (Bio-Rad 64475), est utilisée en bactériologie alimentaire pour le dénombrement des bactéries aérobies psychrotrophes, mésophiles présentes dans le lait, les viandes, les produits à base de viande, les autres produits alimentaires, ainsi que pour l'analyse des produits pharmaceutiques, des produits cosmétiques et de leurs matières premières.

- **Principe** : Les substances nutritives apportées par la Tryptone, les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure et le glucose (source énergétique) favorisent la croissance de la plupart des bactéries à dénombrer.

- **Préparation** : Mettre en suspension 20,5 g du milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Puis porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et le maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution. Ensuite, stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

- **Ensemencement** : Le milieu est refroidi après stérilisation et maintenu à une température de 44 à 47 °C. Ensuite on transfère 1 mL du jus à analyser et de ses dilutions décimales successives dans des boîtes de Pétri stériles. On coule 10 à 15 mL

du milieu avec une homogénéisation parfaite. On laisse solidifier sur une surface froide et on coule éventuellement 4 mL de notre gélose comme deuxième couche qu'on laisse solidifier à nouveau. Ensuite on incube à 30 °C pendant 72 h pour la recherche de bactéries mésophiles.

- **Lecture** : On procède au comptage des colonies pour chaque boîte contenant entre 10 au minimum et 300 colonies au maximum.

2. Coliformes totaux et fécaux

- **Milieu de culture** : La gélose lactosée au désoxycholate (Biokar 062HA) est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des bactéries coliformes dans les eaux, le lait, les produits laitiers et les autres produits alimentaires. Ce milieu est également employé pour la différenciation et l'isolement des entérobactéries à partir des prélèvements d'origine animale.

- **Principe** : L'inhibition des microorganismes à Gram positif est essentiellement due à l'action du désoxycholate de sodium, bien que le citrate de sodium soit également un inhibiteur efficace. La différenciation des entérobactéries est fondée sur la capacité de ces germes à fermenter le lactose.

- **Préparation** : Mettre en suspension 42,5 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Ensuite, porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et le maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution. Ce milieu ne s'autoclave pas.

- **Ensemencement** : Le milieu est refroidi et maintenu à une température de 44 à 47 °C. Ensuite on transfère 1 mL du jus à analyser et de ses dilutions décimales successives dans des boîtes de Pétri stériles. On coule 10 à 15 mL du milieu avec une homogénéisation parfaite. On laisse solidifier sur une surface froide et on coule éventuellement 4 mL de notre gélose comme deuxième couche qu'on laisse solidifier à nouveau. Ensuite on incube à 37 °C pour les coliformes totaux et 44 °C pour les coliformes fécaux pendant 24 h.

- **Lecture** : Les colonies caractéristiques sont rouges de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm et on procède au comptage des colonies pour chaque boîte contenant entre 10 au minimum et 300 colonies au maximum.

3. Levures et moisissures

- **Milieu de culture** : La gélose de Sabouraud au chloramphénicol (Bio-Rad 64644) est recommandée pour l'isolement des levures et des moisissures.

- **Principe** : La peptone pepsique de viande constitue la source azotée de croissance et le glucose comme source énergétique. Le chloramphénicol est un antibiotique thermostable à large spectre antibactérien qui inhibe le développement de la microflore contaminante.

- **Préparation** : Mettre en suspension 45,5 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Ensuite, porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et le maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

- **Ensemencement** : Le milieu est refroidi et maintenu à une température de 44 à 47 °C. On transfère 1 mL du jus à analyser et de ses dilutions décimales successives dans des boîtes de Pétri stériles. Ensuite, on coule 10 à 15 mL du milieu en homogénéisant parfaitement qu'on laisse solidifier sur une surface froide. Après, on incube à 30 °C pendant 3 et 5 jours.

- **Lecture** : On procède au comptage des colonies pour chaque boîte contenant entre 10 au minimum et 300 colonies au maximum.

4. Salmonelles

- **Milieu de culture** : La gélose Hektoen est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries pathogènes (salmonelles) à partir des prélèvements biologiques d'origine animale, des eaux, des produits laitiers et des autres produits alimentaires.

- **Principe** : L'inhibition de la flore à Gram positif est due à la présence des sels biliaires qui peuvent également inhiber légèrement la croissance de quelques souches de microorganismes à Gram négatif. Le milieu contient trois glucides : lactose, saccharose et salicine. La forte concentration en lactose favorise la visualisation des entérobactéries en évitant le problème des fermentations tardives. Les autres glucides ont été introduits afin d'assurer une différenciation plus performante et de réduire la toxicité engendrée par les indicateurs colorés, de manière à obtenir une excellente récupération des Shigella. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des

colonies. Le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en jaune orangé les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les lactose-négatif.

- **Préparation** : Mettre en suspension 75,1 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Ensuite, porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution. Ce milieu ne s'autoclave pas. On laisse refroidir et on maintient le milieu à une température de 44 à 47 °C. Ensuite, on coule en boîtes de Pétri stériles et on laisse solidifier sur une surface froide.

- **Ensemencement** : A la surface des boîtes ainsi préparées ramenées préalablement à température ambiante, on ensemence en stries l'inoculum à partir de notre jus et on incube à 37 °C pendant 24 heures.

- **Lecture** : Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine). Les salmonelles forment des colonies vertes avec un centre noir.

Chapitre 5. Pasteurisation

La pasteurisation thermique inactive les agents pathogènes, les micro-organismes et les enzymes qui affectent négativement la qualité des jus. Ainsi, l'application de la chaleur devrait être minimale et bien équilibrée, être assez puissante pour la décontamination des aliments, tout en permettant une préservation maximale de la qualité originale des jus (Ramaswamy et Abbatemarco, 1996).

1. Principe

La couleur des jus, l'arôme, la saveur et la texture, facilement perçue par les consommateurs des produits alimentaires et la valeur nutritive, sont généralement considérés comme les principaux facteurs de la qualité des jus. Ils sont utilisés pour l'optimisation de la qualité du processus, sachant que les différentes conditions de température de chauffage (T) et du temps (t) conduisent à des effets similaires sur les micro-organismes et l'inactivation enzymatique, ainsi, un procédé qui provoque moins d'effets sur les facteurs de qualité peut être sélectionné (Silva et *al.*, 2003). Une telle optimisation est possible parce que la cinétique de dégradation thermique des facteurs de qualité est beaucoup moins sensible à la température que la destruction de micro-

organismes. Plus la température de pasteurisation appliquée est grande, plus le temps nécessaire pour la même inactivation microbienne diminue (Simpson, 2009).

L'objectif principal de la pasteurisation des aliments à faible acidité est la réduction des agents pathogènes responsables de maladies d'origine alimentaire, alors que dans le cas des aliments à haute acidité, la pasteurisation est destinée à éviter la détérioration et les pertes économiques. Le facteur le plus important pour déterminer le processus à suivre est le pH du produit, qui peut varier du neutre avec un pH de 7 à acide avec un pH de 2.8 (fig.44) (Simpson, 2009).

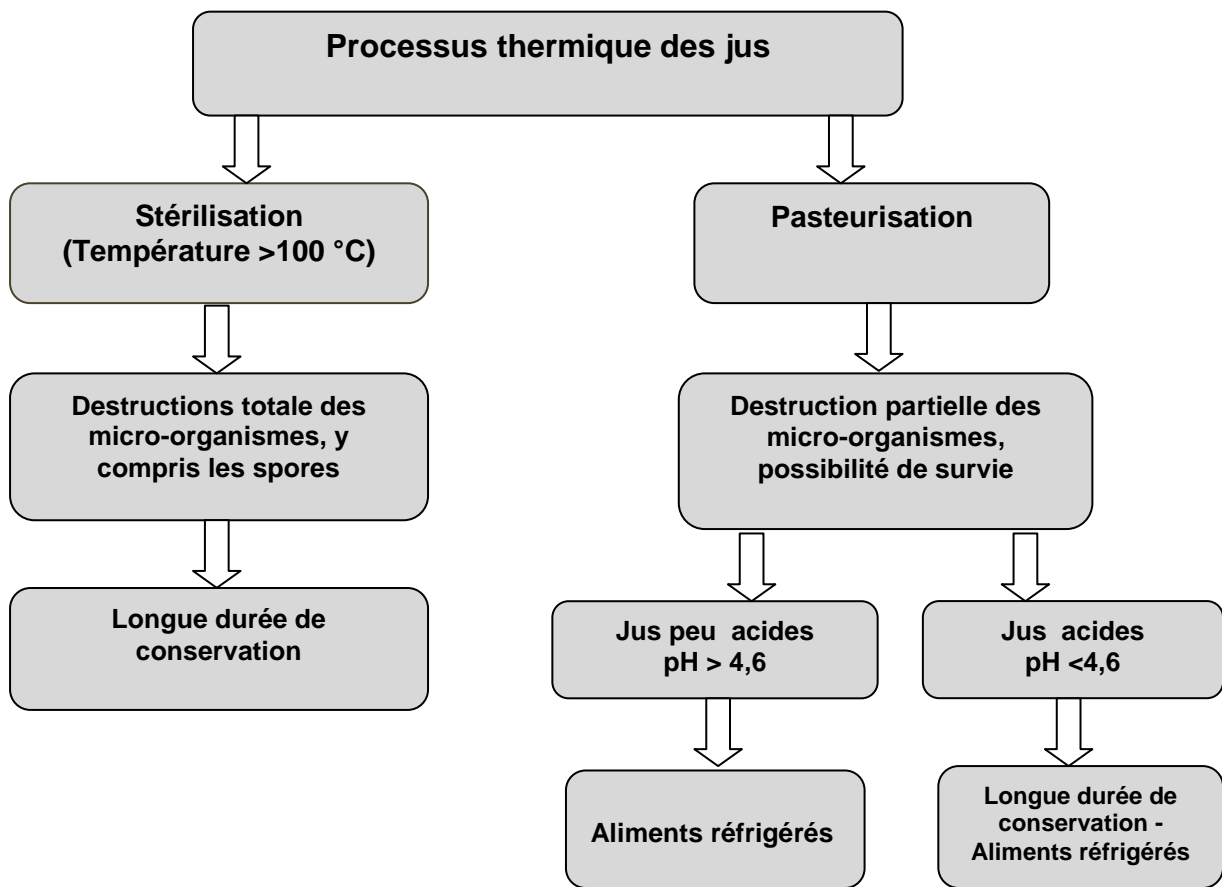


Figure 44 : Processus thermique des jus (Simpson, 2009).

Contrairement à la stérilisation, la pasteurisation des aliments n'est pas stérile, car les spores microbiennes résistantes à la chaleur sont présentes (Lund, 1975). Par conséquent, d'autres formes de conservation telles que la réfrigération, la modification de l'atmosphère (emballage sous vide), l'addition de conservateurs antimicrobiens (sel, acide citrique, acide benzoïque, acide ascorbique, dioxyde de soufre, bicarbonate de diméthyle, etc.), ou des combinaisons de ces techniques sont nécessaires pour la stabilisation et la distribution des produits (Simpson, 2009).

2. Mode opératoire

Le jus de cladode des deux espèces *Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha* rentre parmi la catégorie des jus peu acides (pH > 4,6). Ainsi, pour réaliser une pasteurisation thermique à longue durée de conservation il est nécessaire d'abaisser le pH (pH <4,6). L'acide citrique a été utilisé pour modifier le pH.

Un plan composite centré ordinaire qui fait appel à la méthodologie de la surface de réponse a été utilisé pour optimiser les conditions expérimentales de pasteurisation du jus en analysant l'influence de trois facteurs indépendants : pH (X_1), température (X_2), temps (X_3). Les niveaux dans lesquelles les facteurs ont été analysés sont indiqués au tableau 10.

Tableau 10 : Niveaux des facteurs du plan composite centré

Facteurs	Code des facteurs	Niveaux des facteurs				
		-1,68	-1	0	1	1.68
pH	X_1	3.16	3.5	4	4.5	4.83
Température (°C)	X_2	55	60	85	95	100
Temps (min)	X_3	0	3	9	15	19

Pour déterminer l'influence des paramètres sélectionnés sur les réponses (teneur en polyphénols, flavonoïdes et activité antioxydante) un plan factoriel complet 2^3 avec six axes et 5 points centraux a été utilisé. L'ensemble des expériences est présenté dans les tableaux 11 et 12. L'ordre dans lequel les expériences ont été réalisées a été randomisé pour minimiser l'erreur due à des facteurs exogènes.

L'analyse de la régression linéaire multiple a été réalisée en utilisant le logiciel Statistica 7 (Statsoft Inc.). Les données ont été ajustées au modèle polynomial de second ordre où les coefficients de régression (β) ont été obtenus dans l'équation suivante :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Où Y représente les variables dépendantes (réponses estimées) et β représentent les coefficients de l'équation. Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée pour chaque réponse à une probabilité $p \leq 0,05$ et qui indique si les termes sont significatifs ou non. Afin de vérifier l'adéquation des modèles, les données expérimentales ont été comparées aux valeurs prédites par le modèle de régression et l'erreur moyenne a été déterminée en utilisant l'équation suivante:

$$E(\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y_{\text{exp}} - y_{\text{pred}}|}{y_{\text{exp}}}$$

Où E est l'erreur moyenne, n est le nombre de données expérimentales par points, y_{exp} est la valeur expérimentale et y_{pred} est la valeur prédite par le modèle.

Tableau 11 : Matrice expérimentale

pH	Température (°C)	Temps (min)
-1,00	-1,00	-1,00
-1,00	1,00	1,00
1,00	-1,00	1,00
1,00	1,00	-1,00
0,00	0,00	0,00
-1,00	-1,00	1,00
-1,00	1,00	-1,00
1,00	-1,00	-1,00
1,00	1,00	1,00
0,00	0,00	0,00
-1,67	0,00	0,00
1,67	0,00	0,00
0,00	-1,67	0,00
0,00	1,67	0,00
0,00	0,00	-1,67
0,00	0,00	1,67
0,00	0,00	0,00

Tableau 12 : Plan expérimental

X₁ pH	X₂ Température (°C)	X₃ Temps (min)
3,50	65,00	3,00
3,50	95,00	15,00
4,50	65,00	15,00
4,50	95,00	3,00
4,00	80,00	9,00
3,50	65,00	15,00
3,50	95,00	3,00
4,50	65,00	3,00
4,50	95,00	15,00
4,00	80,00	9,00
3,16	80,00	9,00
4,84	80,00	9,00
4,00	55,00	9,00
4,00	105,00	9,00
4,00	80,00	0,00
4,00	80,00	19,04
4,00	80,00	9,00

Deux répétitions expérimentales ont été effectuées dans les conditions expérimentales et les valeurs prédites et expérimentales ont été comparées.

3^{EME} PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Rendement, analyses physico-chimiques et biochimiques

1. Rendement

Les cladodes récoltés dans la région d'Ouled Dlim ont été choisis suivant des mesures bien définies : la longueur entre 15 et 25 cm et la largeur entre 9 et 13 cm (tabl.13).

Tableau 13 : Dimensions des cladodes des deux espèces *Opuntia ficus-indica* (inermes) et *Opuntia megacantha* (épineuse).

Mois	Espèces	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Poids (g)
Mars	Inermes	24,00 ± 1,7 ^c	11,20 ± 2,1 ^a	337,88 ± 83,8 ^e
	Épineuse	22,70 ± 2,1 ^b	12,40 ± 1,9 ^b	278,13 ± 60,4 ^d
Août	Inermes	24,55 ± 2,5 ^c	12,40 ± 1,5 ^b	110,52 ± 30,8 ^b
	Épineuse	21,15 ± 2,9 ^a	11,67 ± 1,5 ^a	81,68 ± 29,3 ^a
Janvier	Inermes	25,08 ± 2,4 ^d	12,40 ± 1,5 ^b	198,57 ± 54,3 ^c
	Épineuse	23,38 ± 3,4 ^{bc}	12,96 ± 2,7 ^c	200,91 ± 82,1 ^c

a, b, c, d, e Les valeurs ayant la même lettre dans la colonne ne diffèrent pas significativement les unes des autres selon le test de LSD à p < 0,05.

Selon ces dimensions, les cladodes sont âgés de moins d'un an, c'est ce qu'on appelle au Mexique des « napolitos » et qui sont largement consommés comme légume dans ce pays. A ce stade de croissance, les cladodes présentent un grand intérêt nutritionnel : équilibre minéral, bonne teneur en vitamine C, polyphénols et fibres (Hadj Sadok et *al.*, 2008).

Le poids des cladodes change selon les saisons, les cladodes du mois de mars sont les plus lourdes ensuite viennent celles de janvier et en dernière position les cladodes collectées au mois d'août. Il est à noter que le poids des cladodes diffère selon les dimensions choisies. La pluie est la seule source d'eau pour ces plantes, ainsi, elle influence leurs capacités à stocker l'eau. Une irrigation qui permettrait une distribution régulière de l'eau, donnera au figuier de Barbarie ses besoins nécessaires en eau, par conséquent, les cladodes seront riches en eau et leur poids sera plus au moins stable même durant la période de sécheresse.

Les teneurs en jus des cladodes des deux espèces *Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha* ont montré que les cladodes des deux espèces sont riches en eau (tabl.14).

Tableau 14 : Rendement en jus des cladodes des deux espèces *Opuntia ficus-indica* (inermes) et *Opuntia megacantha* (épineuse).

Mois	Rendement (%)	
	Espèce inermes	Espèce épineuse
Mars	51,96	63,39
Août	20,83	35,58
Janvier	38,25	45,19

Les valeurs des rendements varient entre les deux espèces. Les cladodes du mois de mars ont enregistré le plus grand rendement et précisément l'espèce épineuse (63,39%), par contre, le rendement des cladodes collectées en août était le plus faible avec l'espèce inermes (20,83%). La plante a ainsi accumulé de l'eau durant les périodes hivernales et il se traduit par le grand rendement en mars (ANNEXE 1).

Dans une étude qui a été réalisée sur les agrumes, le rendement en jus des mandarines variait de 42,85% à 60,74%, l'orange de 43,53% à 50,79%, le citron 40,39% et le pamplemousse 40,04% (Xu et al., 2008). En effet, nous pouvons comparer le rendement en jus des cladodes avec le rendement en jus des agrumes, sauf en été où l'on observe un très faible rendement (20,83% - 35,58%). Il est à savoir que pour le figuier de Barbarie, les trois mois de sécheresse durant l'été diminuent la phase de la photosynthèse durant la nuit (baisse de 73%), cela diminue excessivement la transpiration, ainsi, 27% d'eau contenu dans le chlorenchyme et 61% d'eau retenu dans le parenchyme sont perdus au cours de cette période (Goldstein et al., 1991).

Les épines jouent à leurs tours un rôle essentiel dans la rétention d'eau, car elles réduisent la surface du cortex à l'exposition au soleil. En effet, le rendement en jus le plus élevé a été enregistré pour les cladodes épineuses.

2. Analyses physico-chimiques de base

La composition des cladodes varie en fonction des facteurs édaphiques, du site de culture, des saisons et de l'âge de la plante (Retamal et al., 1987). Par conséquent, les

valeurs respectives varient à la fois entre les espèces et les variétés et ne doivent pas être considérées comme des valeurs absolues (Rodriguez-Felix, 2002).

Les analyses physico-chimiques de base sur le jus des deux espèces concernent : teneur en eau, cendre, degrés Brix, pH et acidité titrable (tabl.15).

Tableau 15 : Analyses physico-chimiques de base du jus de cladode des deux espèces *Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha*

Mois	Espèces	Teneur en eau (g/100g de jus)	Cendres (g/100g de jus)	Degrés Brix (°B)	pH	Acidité titrable EAC (g/L)
Mars	Inerme	95,68 ± 0,07 ^b	0,82 ± 0,03 ^c	5,5±0,0 ^b	4,68±0,01 ^a	1,45±0,01 ^b
	Épineuse	95,62 ± 0,01 ^b	0,75 ± 0,01 ^a	5,1±0,0 ^b	4,74±0,01 ^a	1,03±0,01 ^a
Août	Inerme	91,00 ± 0,26 ^a	1,74 ± 0,04 ^a	11,0±0,0 ^c	4,77±0,01 ^a	1,88±0,01 ^b
	Épineuse	91,26 ± 0,04 ^a	1,67 ± 0,00 ^b	10,7±0,0 ^c	4,74±0,01 ^a	2,35±0,01 ^c
Janvier	Inerme	95,13 ± 0,11 ^c	0,79 ± 0,02 ^a	6,1±0,0 ^b	4,57±0,01 ^a	1,20±0,01 ^a
	Épineuse	94,24 ± 0,11 ^d	0,96 ± 0,02 ^d	7,2±0,0 ^b	4,49±0,01 ^a	1,52±0,01 ^b

a, b, c, d Les valeurs ayant la même lettre dans la colonne ne diffèrent pas significativement les unes des autres selon le test de LSD à p <0,05.

La teneur en eau varie de 91,00 ± 0,26 à 95,68 ± 0,07 g /100g. Les cladodes du mois d'août ont enregistré les plus faibles valeurs. En général, la teneur en eau des cladodes est comprise entre 88 et 95% (Murillo-Amador et al., 2002). La teneur en cendres varie entre 1,74 ± 0,04 et 0,75 ± 0,01 g /100 g. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées pour les cladodes épineuses du mois d'août et dépassent la teneur en cendre du jus d'orange qui est de 0,37 ± 0,01 g/100g (Kelebek et al., 2009). Nous pouvons observer que ces deux analyses (teneur en eau et cendres) sont inversement proportionnelles entre les deux espèces et par conséquent les cladodes épineuses sont plus riches en composants. En ce qui concerne les résultats du degré Brix, pH et acidité titrable, nous avons eu la même remarque, les cladodes épineuses et plus précisément celles colletées en août avaient les valeurs les plus élevées. Les résultats obtenus pour le Brix varient de 5,1 à 11, les valeurs du mois de mars sont proches du degré Brix du jus d'orange qui est de 11,8 ± 0,0 (Kelebek et al., 2009). Le pH varie entre 4,49 et 4,77 et par conséquent le jus a une acidité moyenne qui dépasse le pH des autres jus de fruits. Par exemple, le pH du jus de pamplemousse est de 3,67 ± 0,01 (Cheong et al., 2012), jus d'orange 3,52 ± 0,01 (Esteve et al., 2005) et il varie entre 2,75 et 4,14 pour le jus de

grenade (Radunic et *al.*, 2015). L'acidité titrable du jus varie entre $2,35 \pm 0,01$ et $1,03 \pm 0,01$, elle est comparable aux autres jus de fruits, mais, plus faible que le citron et l'orange : jus de pamplemousse $0,94 \pm 0,02$ EAC (g/L) (Cheong et *al.*, 2012), jus de grenade $2,72 \pm 0,03$ EAC (g/L) (Vegara et *al.*, 2014), jus d'orange $7,8 \pm 0,30$ (Esteve et *al.*, 2005) et pour le jus de citron elle a été de $52,40 \pm 2,50$ EAC (g/L) (Lorente et *al.*, 2014) vu sa richesse en acide citrique. Le jus de cladode a un pH légèrement élevé, mais son acidité titrable est généralement comparable aux autres jus de fruits. La densité du jus de figuier de Barbarie est de $1,016 \pm 0,001$ g/ mL et elle est inférieure que celle du jus d'orange $1,048 \pm 0,001$ g/ mL (Esteve et *al.*, 2005).

3. Analyses biochimiques

Les analyses biochimiques du jus de cladode des deux espèces *Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha* concernent : polyphénols, protéines, sucres, pectines, tannins condensés, tannins hydrosolubles, flavonoïdes et acide ascorbique (tabl.16).

La teneur en polyphénols varie de 456 ± 8 à 543 ± 1 $\mu\text{g EGA /mL}$. La valeur la plus élevée a été enregistrée en août (543 ± 1 $\mu\text{g EGA /mL}$), en janvier, il n'y a pas eu de différence significative (524 ± 3 $\mu\text{g EGA /mL}$), par contre, en mars une variation significative a été notée (465 ± 7 $\mu\text{g EGA / mL}$).

Une autre étude a été menée sur des cladodes récoltés dans cinq différentes régions au Maroc (Khouribga, Beni Mellal, Bejaad, Oued Zam et Kelaa). Les résultats de la teneur en polyphénols des jus des cladodes récoltés varient entre 478 et 171 $\mu\text{g EGA / mL}$ (Boutakiout² et *al.*, 2015).

Nous remarquons que le site de culture influence considérablement la teneur en polyphénols ce qui est vérifié dans nos travaux. Les résultats du site de Marrakech sont différents des sites de Khouribga, Beni Mellal, Bejaad, Oued Zam et Kelaa. En effet, les teneurs en poly phénols du jus de cladode de notre site d'étude (Ouled Dlim) sont supérieures aux autres sites (ANNEXE 2).

La teneur en composés phénoliques totaux pour d'autres jus de fruits sont: pomme (339 ± 4 $\mu\text{g EGA /mL}$), orange (455 ± 2 $\mu\text{g EGA /mL}$), pamplemousse (535 ± 1 $\mu\text{g EGA /mL}$), ananas (358 ± 3 $\mu\text{g EGA /ml}$), prune (441 ± 6 $\mu\text{g EGA /mL}$), raisin (519 $\mu\text{g EGA /mL}$) (Balasundram et *al.*, 2006) et la pulpe de la figue de barbarie ($218,8 \pm 3$ $\mu\text{g EGA / mg}$) (Fernandez-Lopez et *al.*, 2010). Le jus de cladode est plus riche en polyphénols comparant au fruit de la même plante et aux autres jus de fruits. Il peut être comparé au jus de raisin qui est connu pour sa richesse en polyphénols.

Tableau 16 : Analyses biochimiques du jus de cladode des deux espèces *Opuntia ficus-indica* (inermes) et *Opuntia megacantha* (épineuse).

Mois	Espèce	Polyphénols (μg EAG/mL)	Flavonoïdes (mgER/100mL)	Protéines (gESAB/100mL)	Sucres (g EG /100mL)	Pectines (%)	Tannins condensés (mg EAT/100mL)	Tannins hydrosolubles (mg EAT /100mL)	Acide ascorbique (mg /100 mL)
Mars	Inermes	456 \pm 7 ^b	1,24 \pm 0,01 ^b	0,18 \pm 0,02 ^d	0,76 \pm 0,01 ^b	0,10 \pm 0,02 ^f	12,10 \pm 0,21 ^f	1,28 \pm 0,04 ^a	22,88 \pm 0,62 ^a
	Épineuse	465 \pm 7 ^b	1,22 \pm 0,00 ^{b,c}	0,27 \pm 0,01 ^c	0,66 \pm 0,01 ^b	0,30 \pm 0,04 ^e	13,34 \pm 0,36 ^e	1,36 \pm 0,15 ^a	19,36 \pm 3,11 ^b
Aout	Inermes	543 \pm 1 ^a	1,36 \pm 0,04 ^a	0,50 \pm 0,04 ^a	1,45 \pm 0,03 ^a	2,25 \pm 0,03 ^a	16,90 \pm 0,43 ^b	1,32 \pm 0,05 ^a	17,60 \pm 0,62 ^c
	Épineuse	543 \pm 1 ^a	1,35 \pm 0,05 ^a	0,48 \pm 0,02 ^a	1,30 \pm 0,03 ^a	1,85 \pm 0,02 ^b	18,23 \pm 0,36 ^a	1,33 \pm 0,15 ^a	19,36 \pm 1,87 ^b
Janvier	Inermes	524 \pm 2 ^a	1,21 \pm 0,02 ^{b,c}	0,34 \pm 0,03 ^b	0,85 \pm 0,02 ^b	0,45 \pm 0,01 ^d	14,96 \pm 0,13 ^c	1,24 \pm 0,02 ^a	17,60 \pm 1,87 ^c
	Épineuse	524 \pm 3 ^a	1,18 \pm 0,01 ^c	0,40 \pm 0,04 ^b	0,86 \pm 0,02 ^b	0,95 \pm 0,03 ^c	14,07 \pm 0,14 ^d	1,30 \pm 0,13 ^a	22,00 \pm 0,65 ^a

a, b, c, d, e, f Les valeurs ayant la même lettre dans la colonne ne diffèrent pas significativement les unes des autres selon le test de LSD à p <0,05.

La teneur en flavonoïdes varie de $1,36 \pm 0,04$ à $1,18 \pm 0,01$ mg / 100 mL. Il a été reporté que la teneur en flavonoïdes dans la pulpe de la figue de barbarie est de $0,98 \pm 3,0$ mg/100g (Kuti, 2004). Dans le jus de raisin, qui est considéré comme étant le plus riche en flavonoïdes, sa teneur atteint 7,24 mg / 100 mL (Dos santos lima et al., 2014). Alors, notre jus de cladode contient une quantité plus grande en flavonoïdes comparant au fruit de la même plante, mais, plus faible comparant aux jus de raisin.

La teneur en protéines des cladodes varie de $0,18 \pm 0,02$ à $0,50 \pm 0,04$ g /100 mL. Il a été rapporté que pour les cladodes du figuier de Barbarie, la teneur en protéines se situe entre 0,1 et 1 g/100 g (Stintzing and Carle, 2005).

La teneur totale en sucre varie entre $1,45 \pm 0,03$ et $0,66 \pm 0,01$ g /100 mL. Il a été reporté que pour les cladodes du figuier de Barbarie elle atteint 0,32 g /100 g (Munoz et al., 1995). Dans d'autres études la teneur totale en sucre du jus d'orange a atteint 10,9 g /100 mL (Kelebek et al., 2008), jus de pomme 9,95 g /100 mL, jus de raisin 16,1 g /100 mL, jus d'ananas 11,6 g /100 mL, jus de tomate 3,86 g /100 mL (Braescoa et al., 2013) et jus de pamplemousse 7,64 g/ 100mL (Cheong et al., 2012). Ainsi, nous remarquons que le jus de cladode est pauvre en sucre par rapport à d'autres jus de fruits. En effet, les cladodes sont un aliment faible en calories avec 27 kcal /100 g (Stintzing and Carle, 2005).

Le contenu total en pectine a atteint 2,25%. Nous pouvons le comparer avec le jus de pomme où les valeurs varient de 2,62 à 2,94% (Akhtar et al., 2013).

Le jus cladode est plus riche en tanins condensés ($18,23 \pm 0,36$ mg / 100 mL) par rapport aux tanins hydrosolubles ($1,36 \pm 0,15$ mg /100 mL). La même chose a été observée dans le jus de grenade pour les tanins condensés et hydrosolubles ($43,20 \pm 0,7$ et $10,80 \pm 0,3$ respectivement) (Muhacir-Guzel et al., 2014).

La teneur en acide ascorbique varie de $17,60 \pm 1,87$ à $22,88 \pm 0,62$ mg /100 mL. Il a été reporté que pour les cladodes du figuier de Barbarie, la teneur moyenne en acide ascorbique varie entre 7 et 22 mg /100mL (Stintzing and Carle, 2005). Comparant avec d'autres jus, des valeurs supérieures et inférieures ont été signalées: orange (38,30 mg /100 mL), pomme (11 mg /100 mL), raisin (traces), ananas (9,5 mg /100 mL), tomate (16,6 mg /100 mL) (Braescoa et al., 2013), pamplemousse (22 mg/100 mL) (Cheong et al., 2012) et la pulpe de la figue de barbarie ($18,5 \pm 2,0$ mg/100mL) (Fernandez-Lopez et al., 2010). Nous pouvons conclure que le jus de cladode contient une quantité importante en acide

ascorbique comparable aux jus d'agrumes et plus ou moins égal au fruit de la même plante (Boutakiout¹ et *al.*, 2015).

Les résultats des analyses montrent que les cladodes récoltées en août ont enregistré les valeurs les plus élevées.

L'analyse des minéraux concerne les macroéléments suivant : calcium (Ca), potassium (K), magnésium (Mg) et le sodium (Na) (tabl.17).

Tableau 17 : Teneur en minéraux du jus de cladode des deux espèces *Opuntia ficus-indica* (inermes) et *Opuntia megacantha* (épineuse).

Mois	Espèce	Ca (mg/100 mL)	K (mg/100 mL)	Mg (mg/100 mL)	Na (mg/100mL)
Mars	Inermes	21 ^d	52 ^e	5 ^f	0 ^f
	Épineuse	259 ^a	156 ^c	91 ^a	0 ^b
Août	Inermes	3 ^f	44 ^f	9 ^e	0 ^e
	Épineuse	5 ^e	409 ^a	86 ^b	2 ^a
Janvier	Inermes	30 ^c	156 ^d	45 ^d	0 ^d
	Épineuse	45 ^b	163 ^b	51 ^c	0 ^c

a, b, c, d, e, f Les valeurs ayant la même lettre dans la colonne ne diffèrent pas significativement les unes des autres selon le test de LSD à $p < 0,05$.

Les résultats montrent que la teneur en minéraux dans le jus cladode varie selon les saisons et les espèces. Le potassium est le minéral principal, sa teneur atteint 409,35 mg /100 mL en août et plus précisément pour l'espèce épineuse. Cette valeur est supérieure à la teneur moyenne de potassium dans les cladodes du figuier de Barbarie (166 mg /100g) (Stintzing and Carle, 2005). Il a été reporté que la quantité de potassium présente dans le jus de pomme était de 106,80 mg /100 mL (Abid et *al.*, 2014), jus de cassis 208,73 mg /100 mL, jus de myrtille 92,96 mg /100 mL, jus de framboise 177,93 mg /100 mL (Konic-Ristic et *al.*, 2011), jus de grenade 259,75 mg /100 mL (Vegara et *al.*, 2014) et jus de citron 131,36 mg/ 100 mL (Lorente et *al.*, 2014) Ainsi, le jus de cladode de figuier de Barbarie est riche en potassium.

Nous observons que le calcium et le magnésium ont environ la même teneur dans le jus cladode, par contre, de faibles teneurs ont été enregistrées pour le sodium (0,025 mg /100 mL). Il a été reporté que la teneur moyenne en calcium pour les cladodes du figuier de Barbarie est de 93 mg / 100 mL alors que le magnésium n'a pas été détecté (Stintzing and Carle, 2005). Dans le jus de pomme, on a 2,95 mg

/100 mL de calcium, 18,55 mg /100 mL de magnésium et 34,40 mg /100 mL (Abid *et al.*, 2014). Dans le jus de grenade on a 0,67 mg/ mL de calcium, 2,25 mg /100mL de magnésium et 0,48 mg /100 mL de sodium (Vegara *et al.*, 2014). Dans le jus de citron on a 16,79 mg/ 100 mL de calcium, 10,55 mg/ 100 mL de magnésium et 5,16 mg /100 mL de sodium (Lorente *et al.*, 2014). Par conséquent, le jus de cladode contient une quantité moyenne en Ca et Mg, mais pauvre en Na et cela a été démontré pour les autres jus de fruits.

4. Analyse des acides organiques avec HPLC/MS

L'analyse des acides organiques du jus de cladode du figuier de Barbarie a été qualitative, les résultats obtenus sont sous forme de chromatogrammes (Annexe 3) et spectres de masse. Les temps de rétention des standards injectés sont les suivants : acide tartrique (4,18 min), citrique (5,96 min), ascorbique (4,81min) et oxalique (4,06 min). Les profils des chromatogrammes des jus étudiés pour un temps de rétention inférieur à 6 min ont montré la présence de pics qui ne correspondent pas au temps de rétention des standards ainsi que la présence d'amas de pics. Une gamme de dilution est alors nécessaire ainsi que l'incorporation des standards d'une façon individuelle dans le jus afin d'identifier les pics dans le jus. Pour cette étude, nous n'avons pas réussi à finaliser et exploité nos résultats à cause des difficultés techniques et de l'indisponibilité de l'appareil.

Il a été reporté que le principal acide présent dans les cladodes est l'acide oxalique (0,61 mg /g de poids sec). Il joue un rôle intéressant avec le calcium dans le métabolisme des pectines (Stintzing and Carle, 2005). D'autres études ont montré la présence de cristaux d'oxalate de calcium dans le parenchyme des cladodes du figuier de Barbarie (Malainine² *et al.*, 2003). L'acide malique varie de 95 à 98,5 mg/100 g de poids frais. (Stintzing and Carle, 2005). Il a été également reporté que dans les cladodes l'acide malonique et l'acide citrique représentent respectivement 36 et 178 mg /100g de poids frais. Par contre, les cladodes âgées ne contiennent plus d'acide malonique. L'acide tartrique et succinique ont été trouvés seulement en état de traces. Une augmentation en acide piscidique a été signalée et qui est due à l'augmentation avec l'âge, alors que l'acide phorbique a été réduit de moitié de la valeur initiale. Les deux acides phorbique et piscidique sont rarement rencontrés dans la nature et limités aux plantes présentant un métabolisme acide succulent (CAM) (Teles *et al.*, 1984).

5. Analyse des composés phénoliques avec HPLC-DAD

La composition des principales substances phénoliques (flavonoïdes et acides organiques) du jus de cladode d'*Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha* récoltées au mois de mars a été déterminée par des analyses HPLC (tabl.18).

Tableau 18 : Composés phénoliques du jus de cladode d'*Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha* récoltée au mois de mars

Classe	Composés phénoliques	Temps de rétention (min)	Longueur d'onde de détection (nm)	Espèce inerme (µg/mL)	Espèce épineuse (µg/mL)
Acides phénoliques	Acide gallique	5,18	280	2,24	2,92
	Acide vanillique	28,73	280	11,91	14,57
	Acide caféique	29,03	320	ND*	ND
	Acide chlorogénique	30,86	320	1,22	ND
	Acide paracoumarique	44,17	360	41,59	39,72
	Acide férulique	51,78	320	8,44	3,26
	Acide sinapique	54,43	320	7,20	2,36
	Acide ellagique	11,34	280	ND	5,45
	Acide 4-hydroxybenzoïque	-----	280	ND	ND
Flavonoïdes	Gallocatéchine	-----	280	ND	ND
	Epicatechine gallate	18,85	280	13,18	34,83
	Procyanidine B2	34,99	280	21,29	27,12
	Epigallocatéchine	51,78	280	4,04	8,05
	Catéchine gallate	-----	280	ND	ND
	Hyperoside	56,74	360	48,06	164,50
	Isoquercétine	56,93	360	142,77	245,90
	Rutine	57,32	320	7,72	6,98
	Phloridzine	60,31	280	ND	3,80
	Resvératrol	60,32	320	ND	ND
	Quercétine	65,96	360	0,10	1,59
	Catéchine	-----	280	ND	ND
	Epicatechine	40,63	280	0,47	19,49

ND : non détecté

Vingt-deux acides phénoliques et flavonoïdes présents dans le jus de cladode ont été identifiés et quantifiés par comparaison avec les temps de rétention et les spectres UV.

Dans du jus de cladode d'*Opuntia ficus-indica* 14 composés ont été quantifiés et qui sont classés par ordre décroissant comme suit: isoquercétine (142,77 µg /mL), hyperoside (48,06 µg / mL), acide paracoumarique (41,59 µg /mL), procyanidine B2 (21,29 µg /mL), épicatechine gallat (13,18 µg /mL), acide vanillique (11,91 µg /mL), acide férulique (8,44 µg /mL), rutine (7,72 µg /mL), acide sinapique (7,20 µg /mL), épigallocatechine (4,04 µg /mL), acide gallique (2,24 µg /mL), acide chlorogénique (1,22 µg /mL), épicatechine (0,47 µg /mL) et la quercétine (0,1 µg /mL).

Pour l'espèce *Opuntia megacantha* 15 composés ont été détectés et qui sont classés par ordre décroissant comme suit: isoquercétine (245,90 µg /mL), hyperoside (164,50 µg /mL), acide paracoumarique (39,72 µg /mL), d'épicatechine gallate (34,83 µg /mL), procyanidine B2 (27,12 µg /mL), épicatechine (19,49 µg /mL), acide vanillique (14,57 µg /mL), épigallocatechine (8,05 µg / mL), rutine (6,98 µg /mL), acide ellagique (5,45 µg /mL), phloridzine (3,80 µg /mL), acide férulique (3,26 µg /mL), acide gallique (2,92 µg /mL), acide sinapique (2,36 µg /mL) et la quercétine (1,59 µg /mL).

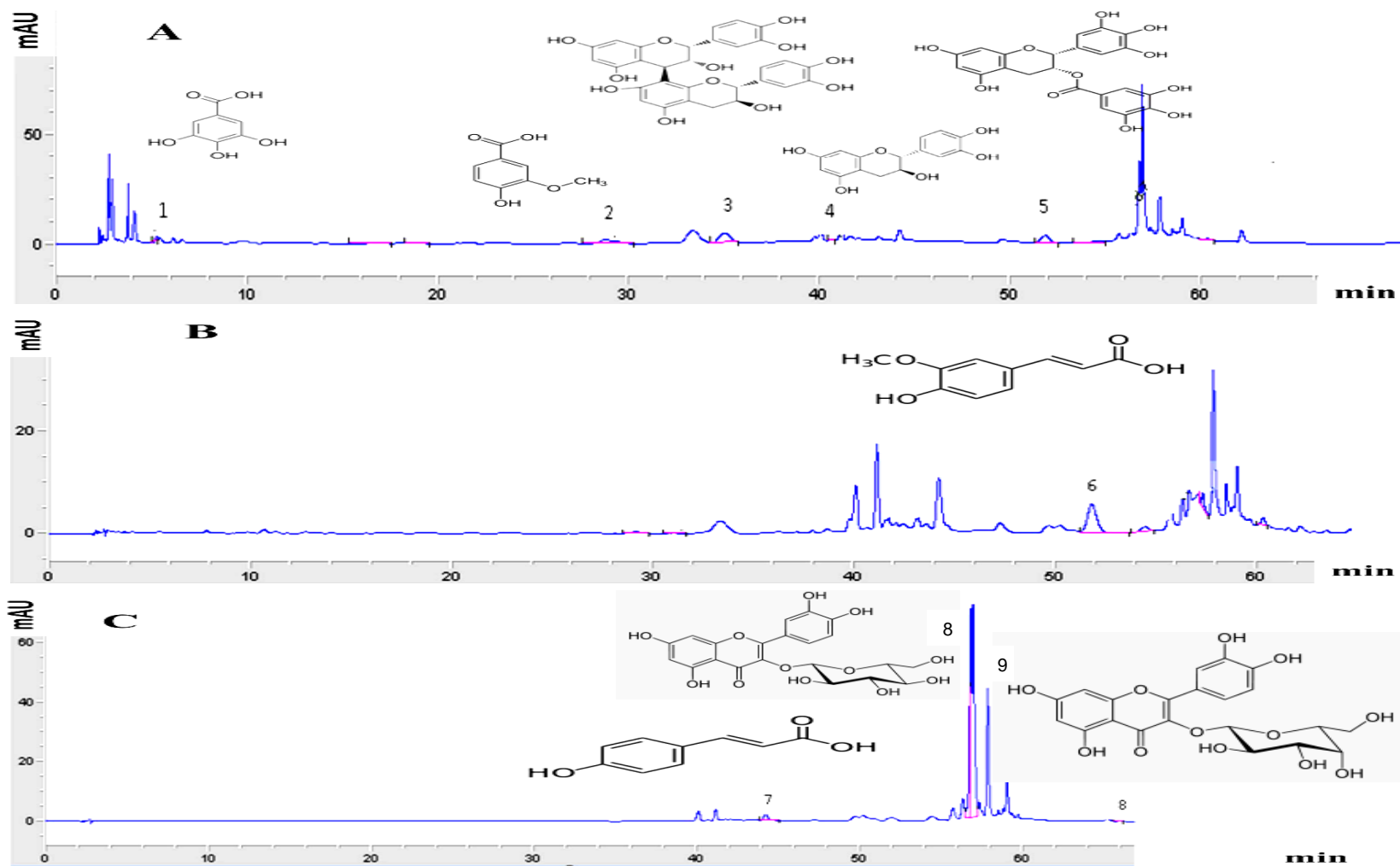
Des études portées sur les cladodes du figuier de Barbarie ont montré la présence de teneurs et de composés différents: acide gallique (0,64 – 2,37µg /g), acide coumarique (14,08 – 16,18 µg /g), 3,4-dihydroxybenzoïque (0,06 – 5,02 µg /g), 4-hydroxybenzoïque (0,5 – 4,72 µg /g), acide férulique (0,56 – 34,77 g /g), salicylicacid (0,58 – 3,54 µg /g), isoquercétine (2,29 – 39,67 µg /g), isorhamnétine-3-O-glucoside (4,59 – 32,21 µg /g), nicotiflorin (2,89 – 146,5 µg /g), rutine (2,36 – 26,17 µg /g) et narcissin (14,69 – 137,1 µg /g) (El-Mostafa et al., 2014). Il est à savoir que l'âge de la cladode, l'environnement, le type de sol et le climat pourraient expliquer ces variations dans le contenu phénolique du jus de cladode (Boutakiout² et al., 2015). Le jus de cladode extrait à partir des cladodes épineuses est plus riche en composés phénoliques par rapport aux cladodes inermes.

L'isoquercétine et l'hyperoside sont les deux composés les plus abondants dans le jus de cladode du figuier de Barbarie. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées dans le jus des cladodes épineuses (245,90 µg /mL et 164,50 µg /mL respectivement). Ces deux composés sont des flavonoïdes de type flavonol qui sont présents sous forme d'hétéroside dont le groupe hydroxyle est substitué en

position 3 par un glucose pour l'isoquercetine et par un galactose pour l'hyperoside. Il a été démontré que les formes glycosides de la quercetine sont absorbées plus efficacement que la quercetine elle-même chez l'Homme, par contre, le rhamnoglucoside (rutine) est absorbé moins rapidement (Erlund et *al.*, 2000). La biodisponibilité de la quercetine diffère selon les aliments et en fonction du type de glycoside qu'elle contient. Par exemple, les oignons qui contiennent des glucosides (isoquercetine) ont une biodisponibilité bien meilleure que la rutine et autres glycosides présents dans les pommes et le thé. Notre besoin journalier en flavonols est de 20 à 35 mg/jour (Graefe et *al.*, 2001). L'isoquercetine joue un rôle important sur notre santé comme : neuroprotecteur, cardioprotecteur, chimiopréventif, antioxydant, anti-inflammatoire, anti-allergique et l'hyperoside joue un rôle important autant qu'hypotenseur (Mun Loke et *al.*, 2008).

La procyanidine B2 est présente dans le jus de cladode du figuier de Barbarie (21,29 - 27,12 µg /mL) avec une quantité moyenne et plus faible par rapport à l'isoquercetine, elle joue un rôle fondamental sur notre santé. Il a été reporté que l'absorption des dimères (procyanidine B1 et B2) était faible et moins important que les flavonols. Les études *in vitro* sur les animaux ont confirmé que leur polymérisation améliore l'absorption intestinale (Donovan et *al.*, 2002). Cependant, les effets de la procyanidine sur notre santé ne nécessitent pas forcément une absorption efficace dans l'intestin. En effet, ce composé peut avoir des effets directs sur la muqueuse intestinale et la protéger contre le stress oxydatif ou les actions carcinogènes. De plus, la consommation d'aliments riches en procyanidines, tels que le cacao, ou des extraits de pépins et de raisins, augmentent la capacité antioxydante du plasma, améliorent le fonctionnement vasculaire et réduisent l'activité des plaquettes chez l'Homme (Williamson and Manach, 2005).

D'autres teneurs ont été enregistrées dans le jus de cladode marocain : acide gallique (0,14 µg /mL), catéchine (54,68 µg /mL), épicatechine (13,73 µg /mL), hyperoside (0,65 µg /mL), isoquercetine (17,58 µg /mL), quercetine (15,58 µg /mL),



mAU: miliarbity unit (unité arbitraire)

Figure 45 : Chromatogrammes HPLC-DAD du jus de cladode d'*Opuntia ficus-indica* à : (A) 280 nm, (B) et 320 nm (C) à 360 nm. Pics: (1) acide gallique, (2) acide vanillique, (3) procyanidine B2, (4) épicatechine, (5) épigallocatechine, (6) acide férulique, (7) acide paracoumarique, (8) isoquercetine et (9) hyperoside.

phlorizin (2,9 µg /mL), rutine (12,15 µg /mL) (Boutakiout² et al., 2015). On remarque que le site de culture influence fortement la composition du jus de cladode en polyphénols, car en comparant avec le jus extrait à partir des cladodes de Marrakech des teneurs élevées et faibles ont été enregistrées.

Le chromatogramme du jus de cladode a été défini selon les longueurs d'onde suivantes : 280 nm, 320 nm et 360 nm (fig. 45).

Dans des études récentes, de nouvelles structures ont été identifiées dans un extrait éthanolique des cladodes d'*Opuntia dillenii* extraites avec du n-butanol dans l'ordre décroissant suivant: opuntioside, isorhamnétine 3 rutinoside, opuntiol, manghaslin (quercétine 3-2G-rhamnosylrutinosid), acide p-hydroxybenzoïque, 1-heptanecanol, acide férulique, 3,4-dihydroxybenzoïque, acide vanillique, 3,3'-dimethylquercetin, acide malique, kaempférol 7-OBD-glucopyranoside, 3-O-methylquercetin 7-O-β-D-glucopyranoside, rutine (quercétine 3-rutinoside), 3,4-dihydroxybenzoïque acide éthylique, 4-éthoxy-6-hydroxyméthyl-α-pyrone, et le kaempférol 3-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranoside. Les composés opuntioside et 4-éthoxy-6-hydroxyméthyl-α-pyrone ont été signalés pour la première fois, tandis que pour l'opuntiol (2-hydroxyméthyl-4-méthoxy-α-pyrone) avait été précédemment détecté dans *Opuntia elatior* et *Opuntia polyacantha* (Qiu et al., 2003).

Chapitre 2. Activité antioxydante et antiradicalaire

L'activité antioxydante et antiradicalaire a été mesurée in vitro en utilisant trois méthodes : DPPH, FRAP et ABTS à partir du même extrait et répété trois fois pour tester la reproductibilité des essais (tabl.19).

Tableau 19 : Activité antioxydante et antiradicalaire des deux espèces *Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha*.

Mois	Espèces	DPPH ($\mu\text{mol TE/mL}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE/mL}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE/mL}$)
Mars	Inerme	1,78 \pm 0,03 ^d	1,74 \pm 0,07 ^e	12,78 \pm 1,69 ^d
	Epineuse	1,78 \pm 0,03 ^d	2,24 \pm 0,01 ^d	13,17 \pm 0,45 ^d
Août	Inerme	3,58 \pm 0,03 ^{ab}	3,31 \pm 0,02 ^a	22,97 \pm 0,39 ^{ab}
	Epineuse	4,10 \pm 0,02 ^a	3,33 \pm 0,03 ^a	23,10 \pm 0,17 ^a
Janvier	Inerme	2,70 \pm 0,04 ^c	2,88 \pm 0,02 ^c	21,17 \pm 0,35 ^{bc}
	Epineuse	3,14 \pm 0,06 ^{bc}	3,06 \pm 0,03 ^b	19,87 \pm 0,74 ^c

a, b, c, d Les valeurs ayant la même lettre dans la colonne ne diffèrent pas significativement les unes des autres selon le test de LSD à $p < 0,05$.

Le jus de cladode obtenu à partir du mois d'août a donné les valeurs les plus élevées de l'activité antioxydante et antiradicalaire par les trois méthodes. Il a été reporté que les mécanismes de réaction avec les tests FRAP et DPPH reposent généralement sur un transfert d'électrons, mais l'essai ABTS implique à la fois le transfert de protons et d'électrons (Prior et *al.*, 2005). Cela confirme les résultats obtenus, avec les deux tests DPPH et FRAP il n'y a presque pas eu de différences significatives entre les résultats par contre avec le test ABTS qui implique les deux mécanismes de transfert, les résultats diffèrent significativement. Il existe une forte corrélation entre les valeurs obtenues avec DPPH et FRAP et les valeurs obtenues avec la méthode ABTS. Le coefficient de corrélation r entre le test DPPH et ABTS est de 0,93 et entre le test FRAP et ABTS 0,95. Donc, les résultats sont fortement corrélés selon une fonction croissante car les deux coefficients de corrélations sont très proches de 1.

Il est à savoir que dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le

DPPH (Molyneux, 2004). Avec le test du radical libre DPPH, nous avons eu un résultat bien inférieur que celui du test du radical libre ABTS, sachant que le test ABTS a pour avantage le transfert de protons H, donc les polyphénols présents dans le jus ont été désavantagés avec le test DPPH qui implique seulement le transfert d'électrons et leurs effets a bien été quantifié avec le test ABTS (fig.46). Par conséquent, les résultats du test ABTS nous indiquent que les polyphénols présents dans le jus de cladode jouent un rôle très important dans l'activité antioxydante et participent ainsi à une augmentation de presque 93% de l'activité antioxydante par transfert de protons H⁺.

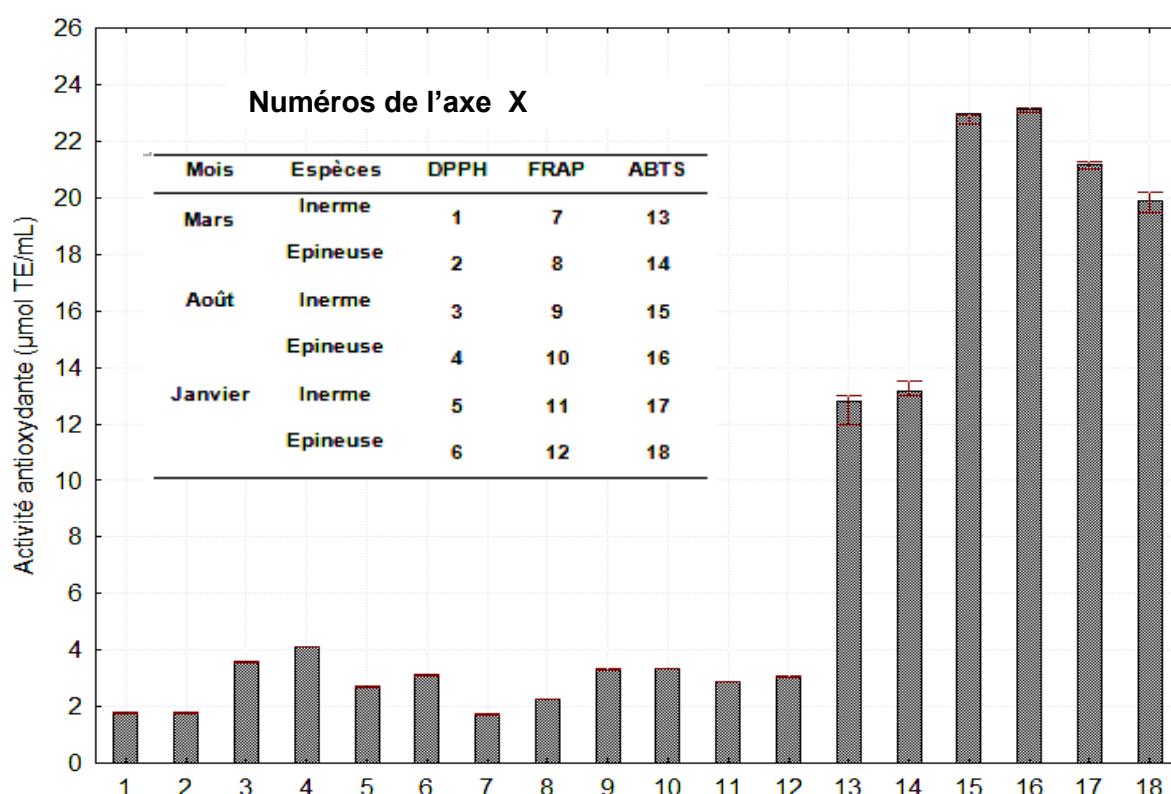


Figure 46 : Activité antioxydante et antiradicalaire des deux espèces *Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha* durant les trois saisons : printemps (mars), été (aout) et hiver (janvier) 2013-2014.

Les droites d'étalonnages du Trolox effectuées pour les trois méthodes DPPH, FRAP et ABTS sont présentées dans la figure 47.

Les droites de régression linéaire expriment le pourcentage d'inhibition du Trolox en fonction des différentes gammes de concentrations. Le coefficient de détermination (r^2) est ainsi calculé et il est très proche de 1 dans les trois cas.

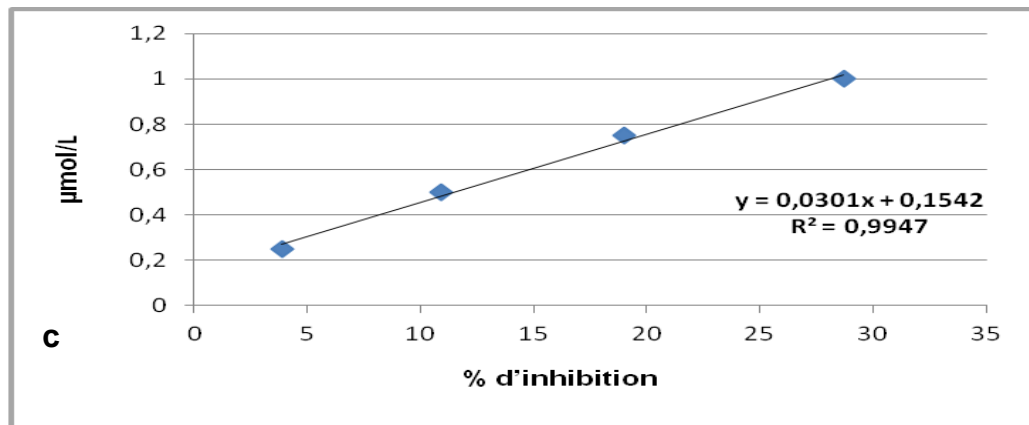
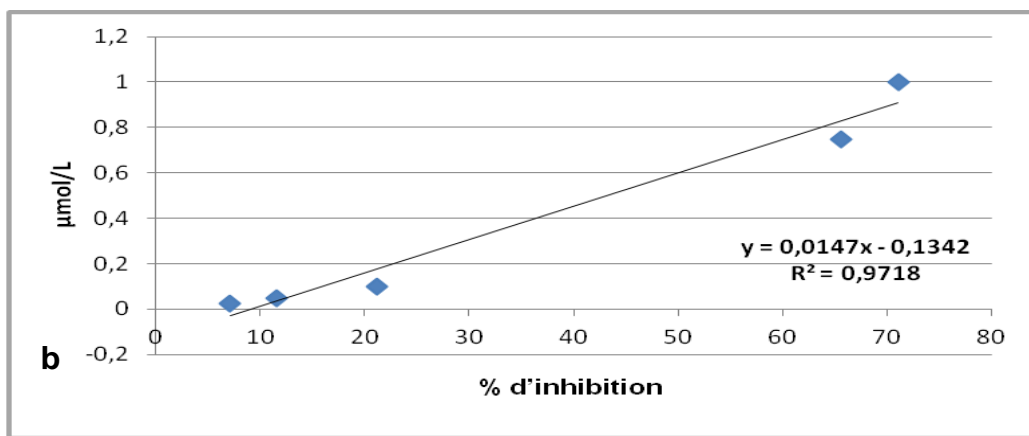
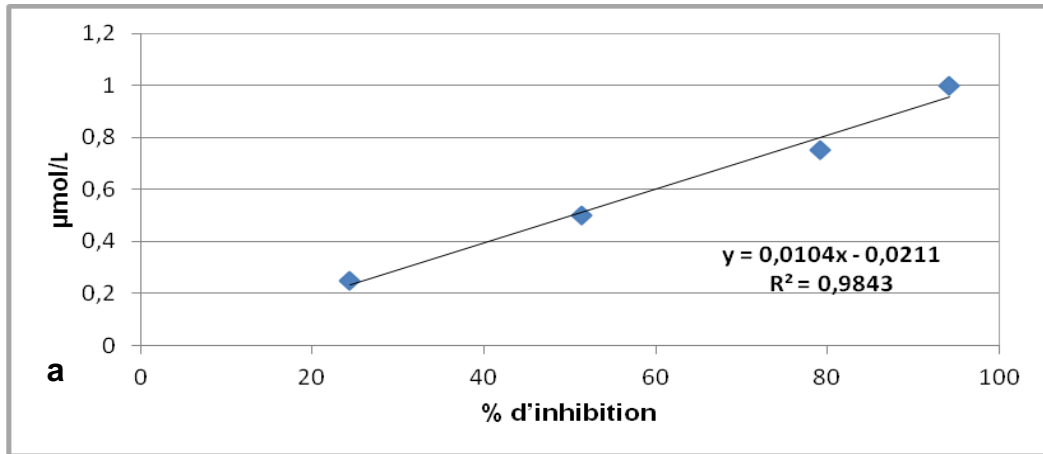


Figure 47 : Droites de régression du Trolox, (a) : DPPH, (b) : FRAP et (c) ABTS.

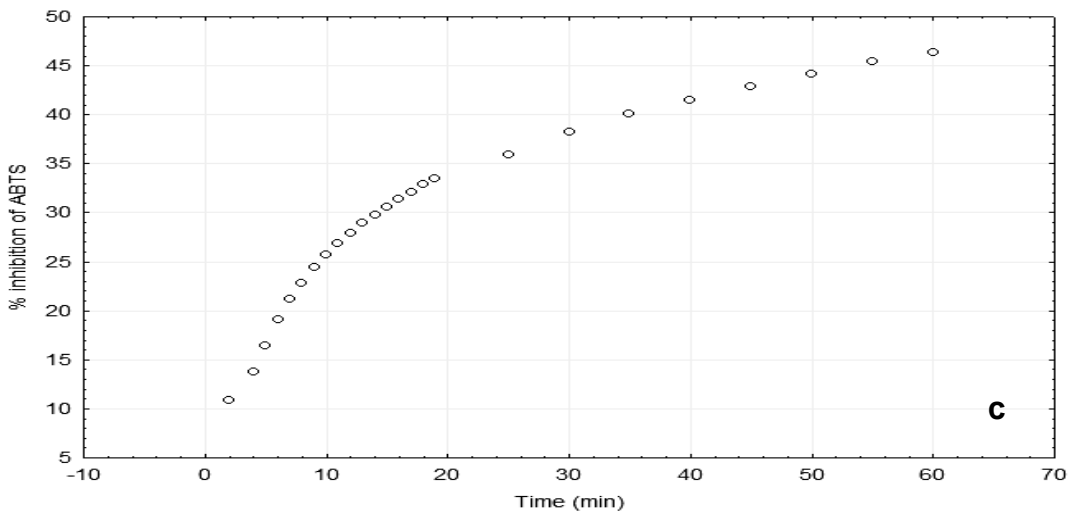
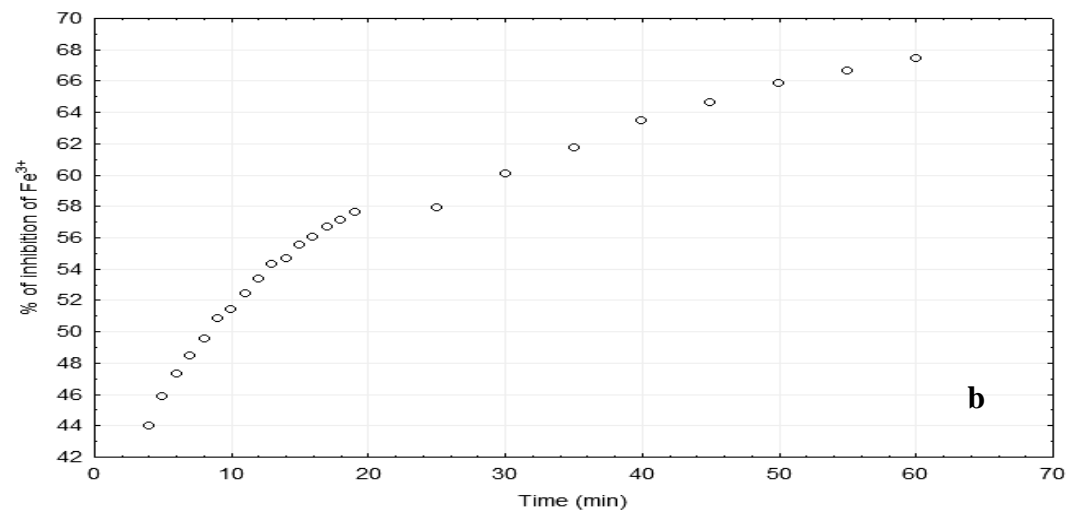
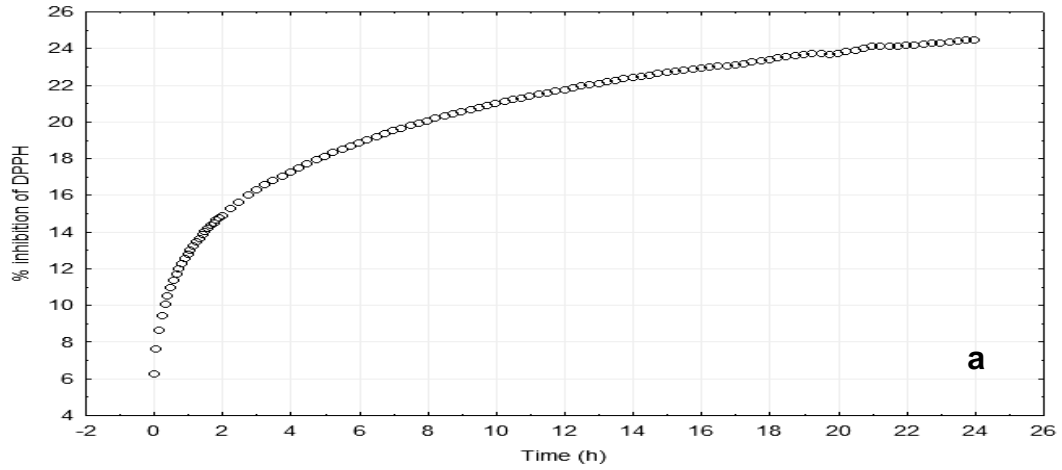


Figure 48: Cinétique de réaction de l'activité antioxydante du jus de cladode, (a) : DPPH, (b) : FRAP, (c) : ABTS.

Le temps de réaction de l'extrait méthanolique du jus de cladode était lent et prenait beaucoup plus de temps par rapport à d'autres jus ou extraits (fig.48).

La détermination du temps de la fin de la réaction est l'étape la plus importante dans ces analyses. La cinétique de réaction au cours du temps pour les dosages DPPH, FRAP et ABTS prend l'allure d'une courbe logarithmique. Le semi-plateau qui apparaît au fil du temps nous informe que la réaction est terminée (Brand-Williams et *al.*, 1995).

Les antioxydants peuvent désactiver le DPPH• principalement par un transfert d'électrons. La difficulté majeure de ces réactions est que la réaction prend beaucoup de temps pour se terminer et cela peut être dû à l'accessibilité stérique. Ainsi, les petites molécules qui ont un meilleur accès au site radical ont une activité antioxydante apparente plus élevée avec ce test. Le DPPH• est un radical azoté stable qui n'a pas de similitude avec les radicaux peroxytes hautement réactifs et transitoires impliqués dans la peroxydation des lipides. En raison de l'inaccessibilité stérique, de nombreux antioxydants qui réagissent rapidement avec les radicaux peroxytes peuvent réagir lentement ou peuvent même être inertes pour le DPPH•. Ainsi, l'activité antioxydante ne peut pas être assez évaluée par la capacité des antioxydants à réagir avec le DPPH• (Prior et *al.*, 2005).

La détermination de la IC₅₀ qui est largement utilisée pour exprimer le résultat du test DPPH ne peut pas être réalisée avec le jus de cladode, car la réaction antioxydante est très lente et n'atteint pas 50% d'inhibition nécessaire pour le piégeage des radicaux DPPH •.

Les analyses FRAP et ABTS sont basées sur l'hypothèse suivante : les réactions s'effectuent si rapidement qu'elles sont terminées entre 4 à 6 minutes, mais ceci n'est pas toujours vrai. Les résultats du test FRAP peuvent varier énormément en fonction du temps. Les phénols ont une réaction rapide en se liant au fer ou se décomposent en composés ayant une réactivité inférieure, par conséquent, ils ont un temps de réaction court (4min). Toutefois, certains polyphénols réagissent plus lentement et nécessitent de plus longues durées de réaction, par exemple, 30 min. L'ordre de réactivité d'une série d'antioxydants peut varier considérablement et même s'inverser, selon le temps d'analyse (Pulido et *al.*, 2000). Il a été montré que le dosage des polyphénols alimentaires avec le test FRAP se fait sur des extraits de méthanol et d'eau. L'absorption augmente lentement pour les polyphénols tels que l'acide caféique, l'acide tannique, l'acide férulique, l'acide ascorbique et la

quercétine, allant jusqu'à plusieurs heures de temps de réaction. Ainsi, la détermination du temps de fin de réaction en un seul point peut ne pas représenter une réaction terminée. Le test FRAP mesure en fait seulement la capacité de la réduction de l'ion ferrique, qui n'est pas en rapport avec l'activité antioxydante ou antiradicalaire de façon mécanique et physiologique (Pulido et *al.*, 2000).

Le test ABTS réagit rapidement avec les antioxydants, généralement dans 30 minutes (Lemanska et *al.*, 2001). Cependant, pour les réactions lentes les résultats du test ABTS ne peuvent pas être les mêmes, et ils peuvent prendre un certain temps pour atteindre un point de terminaison. Ainsi, en utilisant un temps de réaction de courte durée (4 ou 6 min), on aura une sous-estimation des résultats car la réaction n'est pas encore terminée. Van den Berg et *al.* (1996) a conclu que «l'évaluation quantitative de l'activité antiradicalaire en utilisant l'essai ABTS peut être aberrante, voire impossible, mais il peut être utilisé pour fournir un ordre de classement des antioxydants".

Il a été reporté que l'activité antioxydante par les méthodes DPPH, FRAP et ABTS des plantes médicinales, des fruits et des légumes est due à des composants actifs et qui sont majoritairement des polyphénols (Moon and Shibamoto, 2009).

L'activité antioxydante des acides phénoliques et leurs esters dépend du nombre de groupes hydroxyles dans la molécule qui serait renforcée par encombrement stérique (Rodrigues-Felix et *al.*, 1988). Les propriétés chimiques des polyphénols en terme de disponibilité des hydrogènes phénoliques comme donneurs d'hydrogènes et piègeurs de radicaux prédisent leur activité antioxydante (Renaud et *al.*, 1992). Les composés phénoliques des plantes réagissent avec les protéines et les enzymes et forment des liaisons covalentes (Kroll et *al.*, 2003). Ces liaisons diminuent l'activité antioxydante des composés phénoliques. Néanmoins, une fixation covalente aux protéines signifie généralement une perte de l'activité antioxydante des polyphénols comme la quercétine (Rohn et *al.*, 2004). Ces interactions entre les protéines et les phénols peuvent également avoir lieu *in vivo*. A cet égard, les protéines du plasma peuvent masquer l'activité antiradicalaire (essai ABTS) des composés phénoliques (quercétine, rutine et catéchine) (Arts et *al.*, 2001).

Pour qu'un polyphénol soit défini comme un antioxydant, il doit satisfaire deux conditions fondamentales, d'une part, lorsqu'il est présent en faible concentration par rapport au substrat à oxyder, il peut retarder ou prévenir l'auto-oxydation ou

l'oxydation du radical libre, d'autre part, le radical résultant formé après oxydation doit être stable par liaison hydrogène intramoléculaire (Halliwell, 1990). Une étude a défini l'ordre de classement des constituants polyphénoliques suivant leur activité antioxydante par le test ABTS en équivalent de Trolox est qui se présente comme suit: épicatechine gallat (4,9 mM) > quercétine (4,7 mM)> épigallocatechine (3,8 mM)> acide gallique (3,01 mM)> ideain (2,9 mM)> épicatechine (2,5 mM) > catéchine (2,4 mM)> rutine (2,35 mM) (Rice-Evans et *al.*, 1995). La plupart de ces polyphénols sont présents dans le jus de cladode et plus particulièrement l'isoquercétine (142,77 - 645,90 µg /ml). Cette dernière a le même effet thérapeutique que la quercétine et peut être responsable d'une grande partie de l'activité antioxydante. Elle appartient avec l'hyperoside qui est aussi présent en grande quantité (48,06 – 164,50 µg /mL) à la famille des flavonoïdes qui sont considérés comme des antioxydants puissants piègeurs de radicaux libres, grâce à leurs capacités comme donneurs d'hydrogènes de leurs groupes hydroxyles. Les groupes hydroxyles constituent une source d'atomes "H" disponibles, de sorte qu'ils peuvent être délocalisés sur la structure des flavonoïdes (Di Majo et *al.*, 2005).

Il a été reporté que les flavan-3-ols sont des antioxydants très puissants (Wang et *al.*, 2000). Les flavonols (par exemple, la quercétine) et les acides hydroxycinnamiques (par exemple, l'acide caféique et l'acide férulique) sont plus puissants que l'acide ascorbique (vitamine C) comme inhibiteur de l'oxydation forcée de l'acide linoléique en présence du radical libre AAPH (2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide, dihydrochloride) (fig.49) (Counet et *al.*, 2003).

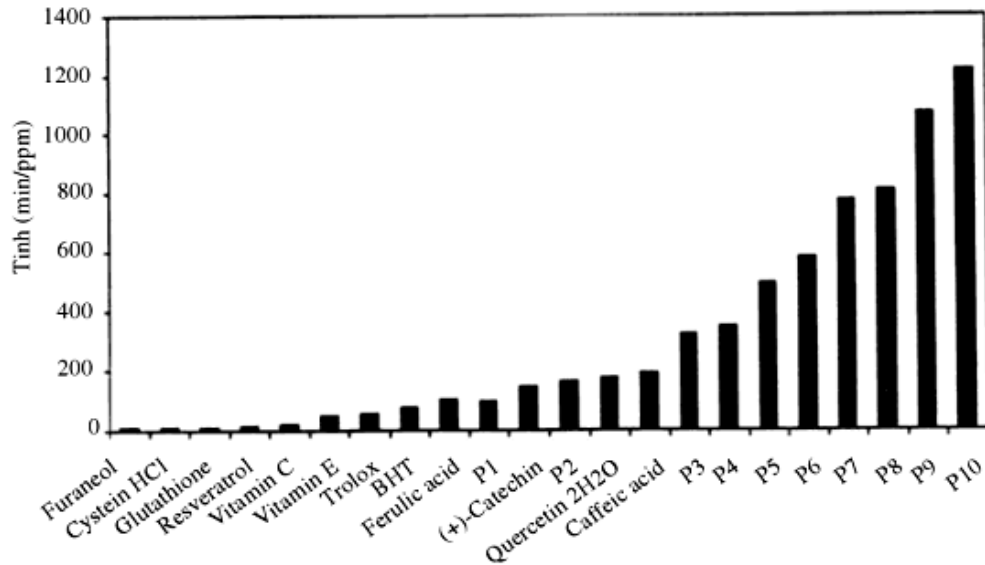


Figure 49 : Efficacité de dix fractions purifiées de procyanidines de chocolat et de douze antioxydants commerciaux (Counet et *al.*, 2003). P1 à P10= monomère à décamère.

Le resvératrol affiche dans ce même test une activité antioxydante moindre. Dans d'autres expériences, il s'est par contre révélé plus efficace à piéger les radicaux peroxydes et hydroxydes que le BHT et les vitamines C et E voir même que la catéchine (Soares et *al.*, 2003).

Le jus de citron a une activité antioxydante plus basse que le jus de cladode: DPPH ($0,26 \pm 0,09 \mu\text{mol TE/ mL}$), FRAP ($0,32 \pm 0,08 \mu\text{mol TE/ mL}$), ABTS ($14,46 \pm 0,30 \mu\text{mol TE/ mL}$) (Barreca et *al.*, 2011). Pour le jus de grenade, la valeur la plus grande avec le test ABTS qui a été enregistrée avec le jus de cladode de l'espèce épineuse du mois d'août ($23,10 \pm 0,17 \mu\text{mol ET/ mL}$) coïncide plus au moins avec son activité antioxydante ($23,78 \pm 4,88 \mu\text{mol ET/ mL}$) (Vegara et *al.*, 2014). Avec le test FRAP le jus de grenade donne de plus grands résultats ($13,04 \pm 2,03 \mu\text{mol ET/ mL}$) comparant à notre jus de cladode (Vegara et *al.*, 2014). Dans une autre étude réalisée sur une gamme de jus fraîchement pressé, le test ABTS a donné les résultats suivants : jus de pamplemousse $8,45 \pm 2,35 \mu\text{mol ET/ mL}$, jus de citron $4,02 \pm 0,87 \mu\text{mol ET/ mL}$, jus de mandarine $8,89 \pm 2,57 \mu\text{mol ET/ mL}$ et jus d'orange $9,11 \pm 2,01 \mu\text{mol ET/ mL}$. Le test FRAP a été effectué sur les mêmes jus et les résultats sont les suivants : jus de pamplemousse $28,5 \pm 2,30 \mu\text{mol ET/ mL}$, jus de citron $10,2 \pm 1,14 \mu\text{mol ET/ mL}$, jus de mandarine $30,5 \pm 2,91 \mu\text{mol ET/ mL}$ et le jus d'orange $32,3 \pm 2,54 \mu\text{mol ET/ mL}$. Ces valeurs sont trois fois plus grandes que ceux de leurs jus commerciaux respectifs (Alvarez et *al.*, 2014). Nous remarquons que le test FRAP a donné des résultats plus intéressants comparant

au test ABTS dans cette étude, ce qui indique que les antioxydants présents dans ces jus exercent une forte activité antioxydante plutôt qu'antiradicalaire, mais le jus de cladode a donné de plus grands résultats avec le test ABTS. Il a été reporté que pour la figue de barbarie l'activité antioxydante avec le test ABTS est de $6,70 \pm 0,73 \mu\text{mol ET/ g}$ de fruit frais et qui est largement faible comparant au jus de cladode par le test ABTS. Par contre avec le test DPPH elle a été un peu élevée ($5,22 \pm 0,89$) comparant au jus de cladode (Fernandez Lopez et al., 2010) Ainsi, même si nous avons eu une réaction antioxydante lente pour notre jus de cladode, et qui peut être due à l'inaccessibilité stérique, aux protéines ou aux enzymes, la richesse du jus en composants antioxydants nous a donné de bons résultats et précisément avec le test ABTS. Des analyses plus approfondies de l'activité antioxydante pourront déterminer la cause de ce problème, à savoir, l'extraction des composés individuellement et leurs interactions (polyphénols, sucres, vitamines, etc.) et ainsi définir le pouvoir antioxydant de chaque combinaison.

Il a été reporté que la teneur des métabolites primaires et secondaires est fortement influencée par le stress de la plante quand elle exposée aux conditions de sécheresse sévère pour les feuilles de raisin. La teneur de la majorité des métabolites (environ 60% des métabolites primaires et environ 85% des polyphénols) a augmenté lors de la sécheresse et cela est dû au stress. Parmi les métabolites primaires, on cite l'acide citrique et l'acide glycérique qui ont été fortement influencés par un traitement de stress face à une sécheresse courte et prolongée, alors que les polyphénols ont été influencés par un traitement de sécheresse prolongée (Griessera et al., 2015). Ceci correspond à nos résultats, car dans des conditions de stress, les métabolites secondaires et principalement les polyphénols augmentent et en particulier les flavonoïdes sans oublier les analyses biochimiques qui concernent les métabolites primaires ont augmenté à leurs tours. Le jus extrait des cladodes épineuses nous a donné des valeurs plus élevées. Il a été signalé que dans des conditions de stress, les cladodes inermes peuvent commencer à développer des épines (Mulas et al., 2004). L'augmentation des métabolites secondaires comme les polyphénols chez les cladodes épineuses et majoritairement due au développement d'un mécanisme biochimique et physiologique fortement actif chez *Opuntia megacantha* pour faire face à des périodes de sécheresse extrême et longues. La présence d'épines est le principal paramètre physiologique apparent, car il réduit la surface d'exposition au soleil pour

réduire la perte d'eau. Les analyses biochimiques et la teneur en polyphénols ont démontré cette hypothèse en donnant des valeurs plus élevées pour les cladodes épineuses. Donc, *Opuntia megacantha* produit des métabolites primaires et secondaires plus élevés qu'*Opuntia ficus-indica*. Il est aussi à noter que les rendements en jus durant le mois d'août sont faibles, ainsi, les composées peuvent être concentrées et c'est ce qui pourrait expliquer les teneurs élevées qui ont été enregistrées durant cette période.

Chapitre 3. Pasteurisation

1. Analyses microbiologiques

Les résultats de l'analyse microbiologique sur le jus de cladode (flore totale, coliformes totaux, coliformes fécaux, levures, moisissures et les salmonelles) constituent le principal élément qui déterminera le couple temps / température nécessaire pour une pasteurisation (tabl.20), sans oublier le pH qui a été introduit, car le jus a une acidité qui varie entre 4,49 et 4,77 et se trouve par conséquent dans les limites du pH admissible pour une pasteurisation (pH < 4,6).

Le choix des 3 facteurs (pH, température et temps) a été déterminé suivant un plan d'expérience qui par la suite nous aidera à déterminer la valeur optimale des facteurs qui nous donneront une bonne teneur en polyphénols, flavonoïdes et en activité antioxydante.

Parmi les 17 essais, seuls 4 d'entre eux ont montré la présence de micro-organismes. Les essais 3, 8 et 12 montrent l'influence du pH sur le développement des micro-organismes.

Tableau 20 : Essais microbiologiques sur le jus de cladode

Essais	pH	Température (°C)	Temps (min)	Flore totale (UFC/mL)	Coliformes totaux (UFC/mL)	Coliformes fécaux (UFC/mL)	Levures et moisissures (UFC/mL)	Salmonelle (UFC/mL)
1	3,5	65,0	3,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
2	3,5	95,0	15,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
3	4,5	65,0	15,0	1.5 10 ³	< 1	< 1	< 1	< 1
4	4,5	95,0	3,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
5	4,0	80,0	9,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
6	3,5	65,0	15,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
7	3,5	95,0	3,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
8	4,5	65,0	3,0	5 10 ³	< 1	< 1	Nappe	< 1
9	4,5	95,0	15,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
10	4,0	80,0	9,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
11	3,2	80,0	9,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
12	4,8	80,0	9,0	15	< 1	< 1	< 1	< 1
13	4,0	55,0	9,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
14	4,0	105,0	9,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
15	4,0	80,0	0	10 ⁴	10 ³	5	Nappe	< 1
16	4,0	80,0	19,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
17	4,0	80,0	9,0	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

A un pH = 4,5 et à une température basse de 65 °C il y'a présence de micro-organismes quelque soit le temps de pasteurisation. Cela est confirmé avec un pH assez grand de 4,8 et malgré une haute température de pasteurisation de 80 °C et un temps important de 9 min il y'a eu développement de micro-organismes. Par contre, pour l'essai 9 avec un même pH = 4,5 et une haute température de 95 °C il n'y a pas eu de présence de micro-organismes car, la haute température de chauffage a détruit les micro-organismes. Pour l'essai 15, malgré un pH bas de 4,0 mais sans chauffage il y'a eu développement de micro-organismes.

Les résultats obtenus confirment l'importance du pH dans la pasteurisation et qui doit être combiné avec une température et un temps optimal.

Afin de décrire le comportement des microorganismes dans différentes matrices, il existe une base de données (ComBase) qui est utilisée à des fins de microbiologie prévisionnelle. Les données incluses dans ComBase ont été obtenues de la coopération des instituts de la recherche et de la littérature et sont accessibles au public via Internet. Ce logiciel effectue des requêtes pour les dossiers qui correspondent à un certain nombre de facteurs alimentaires et environnementaux, comme la température, le pH et l'activité de l'eau. Toute personne intéressée à l'innocuité microbienne et la qualité des aliments peut explorer ComBase et ses outils associés, sans frais. Grâce à une interface Internet, l'utilisateur définit les critères qui l'intéressent dans un scénario de microbiologie alimentaire. Ceci comprend l'identification du type ou de l'espèce de l'organisme, d'une catégorie d'aliments, pH, température, activité de l'eau (ou la concentration en NaCl) et les conditions alimentaires spécifiques.

2. Analyses chimiques

Les résultats des analyses chimiques sont effectués sur le jus de cladode selon le plan d'expérience constitué de facteurs indépendants (pH, température et temps) et de facteurs dépendent (polyphénols, flavonoïdes et DPPH) (tabl.21).

Les résultats obtenus sont influencés par l'ajout de l'acide citrique pour réguler le pH, la température et le temps de pasteurisation, ainsi, l'analyse statistique nous aidera à interpréter les résultats.

Selon les résultats obtenus, il n'y a pratiquement pas d'impact des différentes conditions de traitement sur les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes, ce qui est bon signe en vue de valorisation du jus qui doit être valorisé par la suite. Il est

aussi à noter que l'activité antioxydante augmente avec la température de traitement alors que normalement on s'attendrait au cas contraire.

Tableau 21 : Résultats des analyses chimiques (en moyenne) selon le plan d'expérience.

Essais	pH	Température (°C)	Temps (min)	Polyphenols (µg EGA /mL)	Flavonoïds (mg ER/100mL)	DPPH (µmol ET/mL)
1	3,5	65,0	3,0	433,97	1,36	3,07
2	3,5	95,0	15,0	435,18	1,42	3,06
3	4,5	65,0	15,0	434,75	1,33	1,37
4	4,5	95,0	3,0	432,16	1,59	1,53
5	4,0	80,0	9,0	434,05	1,45	2,67
6	3,5	65,0	15,0	433,94	1,38	2,88
7	3,5	95,0	3,0	433,56	1,37	3,03
8	4,5	65,0	3,0	434,47	1,44	1,90
9	4,5	95,0	15,0	433,95	1,51	0,21
10	4,0	80,0	9,0	433,27	1,40	2,60
11	3,2	80,0	9,0	431,64	1,33	4,48
12	4,8	80,0	9,0	434,86	1,32	2,74
13	4,0	55,0	9,0	434,07	1,37	3,18
14	4,0	105,0	9,0	434,93	1,47	4,35
15	4,0	80,0	0	435,24	1,34	3,28
16	4,0	80,0	19,0	434,94	1,37	3,67
17	4,0	80,0	9,0	434,78	1,37	4,43

3. Analyse des surfaces de réponse

En utilisant les résultats présentés au tableau 20 et 21, une régression linéaire multiple a été effectuée avec un modèle polynomial de second ordre. De plus, une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour estimer la signification statistique de chaque facteur et de leur interaction (tabl. 22).

Afin de déterminer si le modèle est significatif, on étudie la signification statistique de l'équation de régression qui a été vérifiée par le test-F et ANOVA pour les surfaces de réponses. La valeur P a été utilisée pour vérifier la signification de chaque coefficient et qui indique la force d'interaction entre chaque paramètre. Plus

les valeurs de P sont petites, plus la signification du coefficient correspondant est grande (Sheng et *al.*, 2012). Les valeurs P du modèle dans les 3 cas étaient bien plus grandes que 0,0001 ce qui indique que le modèle n'est pas significatif dans cette expérience. Les coefficients de détermination R^2 dans les 3 cas étaient loin de 1, ce qui indique une corrélation non satisfaisante entre valeurs réelles et celles prédites (Sheng et *al.*, 2013). Les valeurs du R^2 ajusté étaient à leurs tours bien loin de 1, ce qui signifie que les résultats obtenus sur la variation des facteurs (flavonoïdes, polyphénols et DPPH) sont peut significatifs dans ce modèle (Cas 3). On peut dire que les résultats obtenus ne suivent pas un modèle polynomial.

➤ Equation de prédiction des flavonoïdes :

$$\begin{aligned} \text{"FLAVONOIDS"} = & 17,96 - 10,9 \cdot \text{PH} - 0,089 \cdot \text{TEMP} + 0,0469 \cdot \text{TEMPS} + 0,0048 \cdot \text{PH} \cdot \text{TEMP} - \\ & 0,011 \cdot \text{PH} \cdot \text{TEMPS} + 7 \cdot 10^{-4} \cdot \text{TEMP} \cdot \text{TEMPS} + 2,733 \cdot \text{PH}^2 + 8 \cdot 10^{-3} \cdot \text{TEMP}^2 - 0,001 \\ & \cdot \text{TEMPS}^2 - 2,32 \cdot \text{PH}^3 + \text{TEMP}^3 + 4 \cdot 10^{-4} \cdot \text{TEMPS}^3 + 2 \cdot 10^{-5} \cdot \text{PH} \cdot \text{TEMP} \cdot \text{TEMPS} \end{aligned}$$

➤ Equation de prédiction des polyphénols :

$$\begin{aligned} \text{"POLYPHENOLS"} = & -25,3 + 304,3 \cdot \text{PH} + 1,857 \cdot \text{TEMP} - 1,04 \cdot \text{TEMPS} - \\ & 0,062 \cdot \text{PH} \cdot \text{TEMP} + 0,0558 \cdot \text{PH} \cdot \text{TEMPS} + 0,0062 \cdot \text{TEMP} \cdot \text{TEMPS} - 73,7 \cdot \text{PH}^2 - 0,021 \cdot \text{TEMP}^2 + 0,0569 \\ & \cdot \text{TEMPS}^2 + 6,004 \cdot \text{PH}^3 + 9 \cdot 10^{-4} \cdot \text{TEMP}^3 - 0,002 \cdot \text{TEMPS}^3 + \text{PH} \cdot \text{TEMP} \cdot \text{TEMPS} \end{aligned}$$

➤ Equation de prédiction du DPPH :

$$\begin{aligned} \text{"DPPH"} = & -165,0 + 88,89 \cdot \text{PH} + 1,775 \cdot \text{TEMP} - 0,012 \cdot \text{TEMPS} - \\ & 0,003 \cdot \text{PH} \cdot \text{TEMP} + 1,529 \cdot \text{PH} \cdot \text{TEMPS} + 0,0104 \cdot \text{TEMP} \cdot \text{TEMPS} - 21,6 \cdot \text{PH}^2 - 0,022 \cdot \text{TEMP}^2 - \\ & 0,062 \cdot \text{TEMPS}^2 + 1,713 \cdot \text{PH}^3 + 9 \cdot 10^{-4} \cdot \text{TEMP}^3 + 0,0019 \cdot \text{TEMPS}^3 - 0,003 \cdot \text{PH} \cdot \text{TEMP} \cdot \text{TEMPS} \end{aligned}$$

Tableau 22 : Analyse de la variance (ANOVA) des surfaces de réponse (Les valeurs de P doivent être égales ou inférieures à 0,0001).

Cas 1 : modèle $Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3$

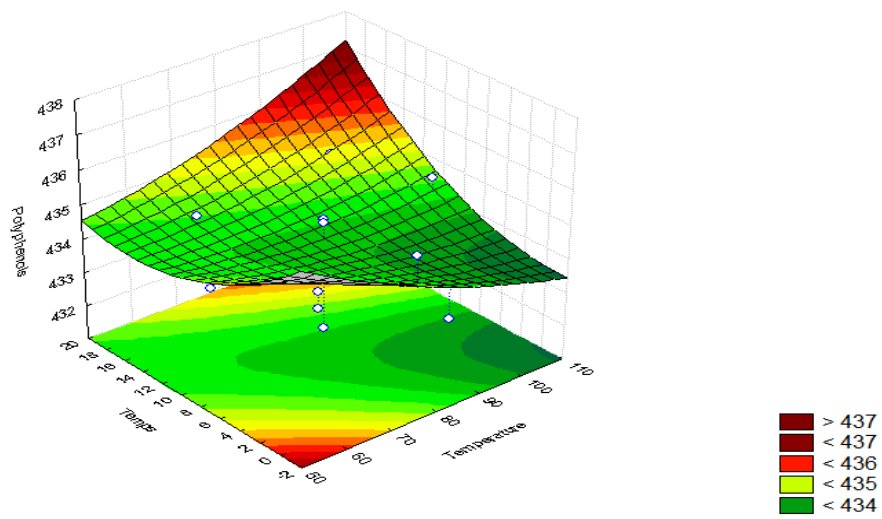
Dependnt Variable	Test of SS Whole Model vs. SS Residual (DATA 2)										
	Multiple R	Multiple R ²	Adjusted R ²	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual	F	p
POLYPHENOLS	0,353003	0,124611	-0,077402	2,034646	3	0,678215	14,29335	13	1,099489	0,616846	0,616267
FLAVONOIDS	0,605017	0,366045	0,219748	0,030542	3	0,010181	0,05290	13	0,004069	2,502062	0,105115
DPPH	0,606447	0,367777	0,221880	7,511651	3	2,503884	12,91280	13	0,993292	2,520792	0,103438
MICRO	0,692001	0,478866	0,358604	1,464766	3	0,488255	1,59406	13	0,122620	3,981864	0,032496

Cas 2 : modèle $Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{123}X_1X_2X_3$

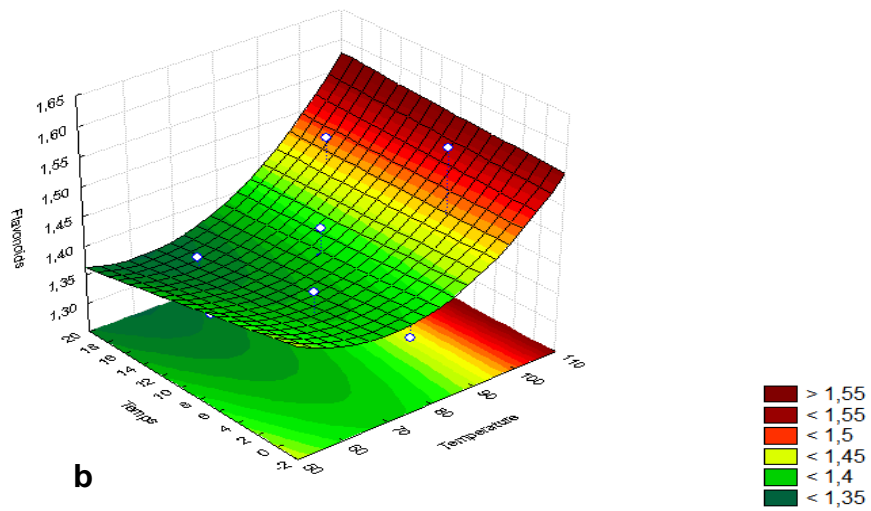
Dependnt Variable	Test of SS Whole Model vs. SS Residual (DATA 2)										
	Multiple R	Multiple R ²	Adjusted R ²	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual	F	p
POLYPHENOLS	0,567382	0,321922	-0,205472	5,256341	7	0,750906	11,07166	9	1,230184	0,610401	0,736071
FLAVONOIDS	0,774570	0,599958	0,288814	0,050060	7	0,007151	0,03338	9	0,003709	1,928234	0,176873
DPPH	0,641281	0,411241	-0,046683	8,399369	7	1,199910	12,02508	9	1,336120	0,898055	0,546051
MICRO	0,801453	0,642327	0,364138	1,964766	7	0,280681	1,09406	9	0,121562	2,308954	0,120667

Cas 3 : modèle $Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{123}X_1X_2X_3$

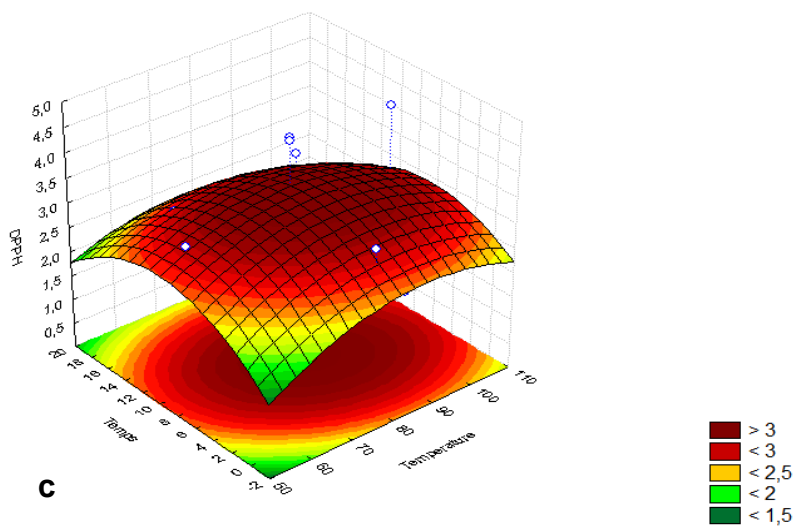
Dependnt Variable	Test of SS Whole Model vs. SS Residual (DATA2)										
	Multiple R	Multiple R ²	Adjusted R ²	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual	F	p
POLYPHENOLS	0,722846	0,522506	-0,273318	8,531473	10	0,853147	7,79652	6	1,299421	0,656560	0,734880
FLAVONOIDS	0,841836	0,708688	0,223168	0,059132	10	0,005913	0,02431	6	0,004051	1,459647	0,333307
DPPH	0,690921	0,477372	-0,393673	9,750071	10	0,975007	10,67438	6	1,779063	0,548045	0,808859
MICRO	0,889526	0,791257	0,443353	2,420317	10	0,242032	0,63851	6	0,106418	2,274353	0,163395



a



b



c

Figure 50 : Surfaces de réponse en 3D en fonction du temps et de la température, (a) : polyphénols, (b) flavonoïdes, (c) DPPH.

Les résultats du plan d'expérience (graphe et équations prédites) sont peu ou non significatifs. Les surfaces de réponses en trois dimensions nous ont donné une idée sur le comportement des composés (polyphénols, flavonoïdes et DPPH) en fonction du temps et de la température (fig.50) et qui mérite d'être exploitée. Les polyphénols ont montré durant le temps de pasteurisation une descente et une remontée en leurs teneurs. Par contre, la teneur en flavonoïdes dessine une montée durant le temps et le DPPH représente un optimum en milieu de traitement (80 °C, 9min).

4. Paramètres de pasteurisation

La stabilité colloïdale d'un jus a toujours été considérée comme un paramètre important de la qualité et influence son acceptabilité au marché. La perte de cette stabilité est généralement attribuée à l'action de l'enzyme endogène de la pectine méthyle-estérase (PME), qui méthoxyle les pectines solubles, permettant aux pectates de calcium (fibres de pectines) de précipiter. La pasteurisation thermique des jus vise à donner une longue durée de conservation et elle est conçue pour inactiver la PME, qui est thermiquement plus résistante que les micro-organismes végétatifs (Timmermans et *al.*, 2011). Afin d'inactiver cette enzyme, une pasteurisation thermique de 15-60 s à 90-95 °C est nécessaire à la pression atmosphérique (Baker and Cameron, 1999). La peroxydase (POD) a été traditionnellement considérée comme responsable de l'oxydation (composés phénoliques) et des modifications de la saveur dans les fruits et légumes. Néanmoins, son lien direct avec la détérioration de la qualité n'a jamais été prouvé (Vámos-Vigyazo, 1981).

L'analyse statistique du plan d'expérience nous aurait donné la valeur optimum des facteurs temps, température et pH qui nous donnerait la meilleure teneur en polyphénols, flavonoïdes et en activité antioxydante, mais qui devrait par la suite être soumise à un test microbiologique si elle ne rentre pas dans les paramètres choisis dans le plan d'expérience.

D'après toutes ces données, la pasteurisation dans un bain-marie doit être effectuée à une température de 95 °C afin d'inhiber la PME et la POD et avoir un jus clair qui conserve sa couleur vert pistache durant une longue période, le temps de pasteurisation est de 3 min, car c'est le minimum qui a été choisi afin de conserver les propriétés nutritionnelles des composés et un pH de 3,5 afin d'inhiber le développement des bactéries et des micro-organismes (< 1 UFC/mL).

Au niveau industriel, la pasteurisation se fait généralement selon une technique appelée « flash pasteurisation » ou pasteurisation éclair, elle consiste à chauffer et refroidir le produit en un minimum de temps (quelques secondes) afin de préserver ses qualités gustatives et nutritionnelles et détruire les microorganismes ciblés. Les paramètres de pasteurisation des jus sont réglementés et elles sont de l'ordre de 90 °C durant 2s ou 84 °C durant 20s (Mazzotta, 2001).

5. Temps de stockage

Afin de déterminer le temps et la température de stockage, trois paramètres ont été étudiés : activité antioxydante (fig.51), teneur en polyphénols (fig.52), indice de brunissement (fig. 53). Le jus a été pasteurisé à 85 °C durant 20 min et un suivi de ces deux paramètres a été réalisé chaque semaine durant 6 semaines selon des températures différentes (4 °C, 20 °C, 35 °C et 45 °C).

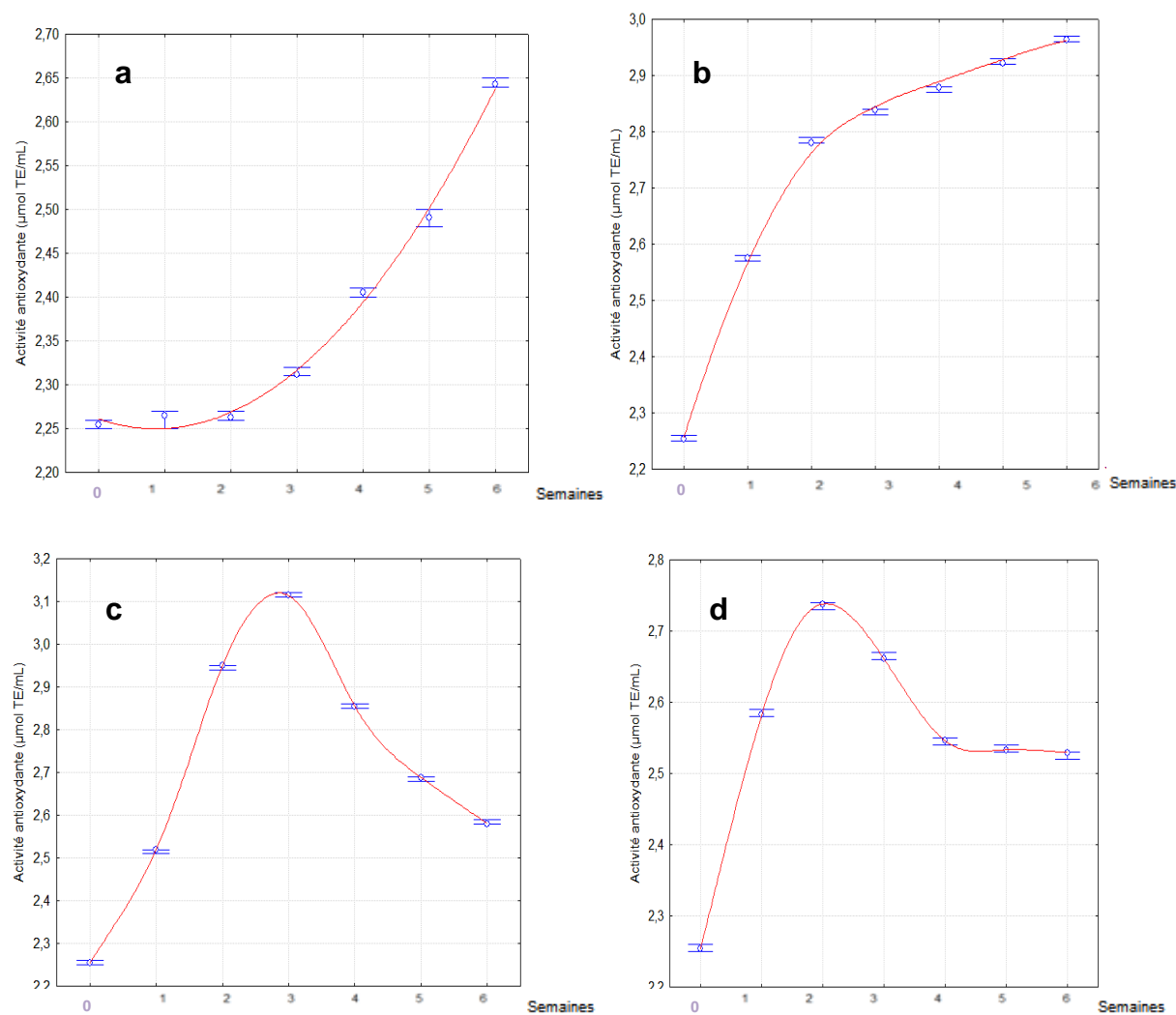


Figure 51 : Effet du stockage sur l'activité antioxydante durant le temps avec le test DPPH à différentes températures, (a) :4 °C, (b) : 20 °C, (c) : 35 °C et (d): 45 °C.

La température de stockage a un effet sur l'activité antioxydante avec le test DPPH. A 4 °C, la courbe prend une allure logarithmique et augmente ainsi à travers les semaines. A 20 °C, l'activité antioxydante augmente à travers le temps, mais la courbe prend une allure exponentielle. Par contre, à 35 °C et 45 °C on remarque une montée de l'activité antioxydante jusqu'à la troisième semaine, ensuite, elle commence à redescendre.

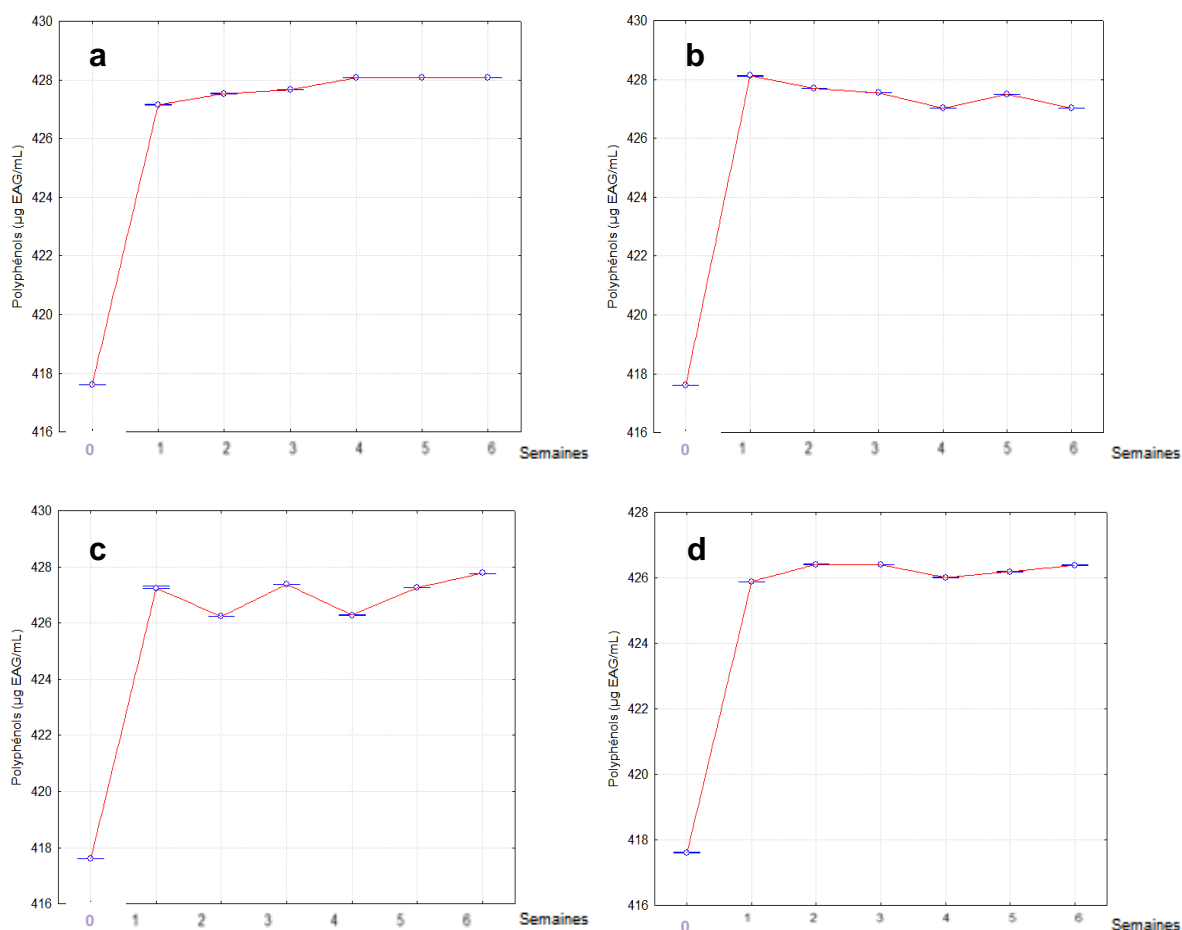


Figure 52 : Effet du stockage sur la teneur en polyphénols à différentes températures, (a): 4 °C, (b): 20 °C, (c): 35 °C et (d): 45 °C.

La teneur en polyphénols reste plus ou moins stable durant le stockage aux températures suivantes : 4 °C, 20 °C, 35 °C et 45 °C. Elle augmente d'une manière significative après la pasteurisation.

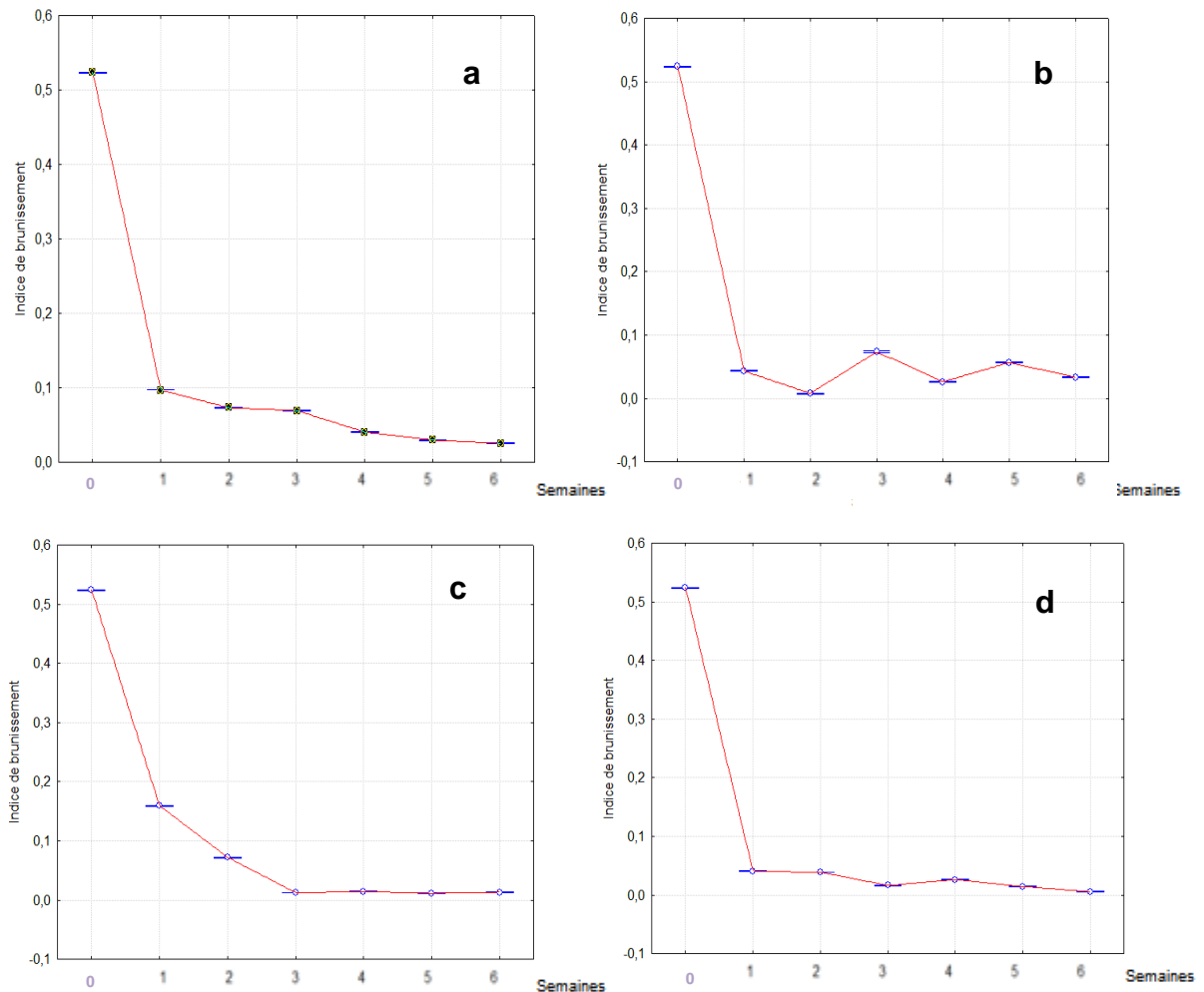


Figure 53 Effet du stockage sur l'indice de brunissement à différentes températures, (a) :4 °C, (b) : 20 °C, (c) : 35 °C et (d): 45 °C.

L'indice de brunissement a été mesuré à la longueur d'onde de 420 nm (Lee and Chen, 1998). Cette méthode consiste à une dilution avec de l'éthanol pour permettre la floculation des particules troubles puis une filtration avec un filtre papier Whatman n°42 avant de lire l'absorbance de la solution obtenue à 420 nm. Ainsi, cette méthode permet d'éliminer l'interférence avec les caroténoïdes et donne une bonne répétabilité selon les auteurs. On remarque que l'indice de brunissement diminue après la pasteurisation et durant le stockage aux températures 4 °C, 20 °C, 35 °C et 45 °C. La même chose a été reportée lors d'une étude menée sur le stockage de jus d'orange entre 2 et 3 mois (Berlinet, 2006).

Une étude comparative des différentes techniques de pasteurisation a montré que durant un stockage à 4 °C d'un jus d'orange pasteurisé (inactivation microbienne partielle) traité thermiquement (72 °C - 20s), en haute pression (HP) (1min - 600 MPa – 5 °C), avec un champ électrique pulsé (PEF) (flux continu - impulsions

unipolaires de 2 μ s à 23 kV / cm, 90 Hz - débit 130 L / h - température d'entrée et de sortie de 38 et 58 °C), les activités enzymatiques résiduelles ont une différence significative. Pour l'inactivation de la PME, aucun traitement n'a été capable de provoquer une inactivation complète, bien que la chaleur et HP fussent les plus efficaces dans la limitation de l'activité de cet enzyme. Durant le stockage, aucune différence significative n'a été enregistrée durant la durée de vie du jus (60 jours) pour les différentes techniques de pasteurisation. La POD (peroxydase) a été complètement inactivée par pasteurisation avec la chaleur et elle était beaucoup moins sensible à HP et PEF. L'activité résiduelle au cours du stockage après HP et PEF n'a montré aucune baisse significative. D'autres paramètres de qualité ont été étudiés (sucres, acides organiques, Vitamine C, et les caroténoïdes) et ils ont montré qu'il n'y avait pas d'impact significatif avec les trois techniques de pasteurisation (Vervoort et *al.*, 2011).

Dans une autre étude sur le jus d'orange, il a été démontré que la vitamine C et les acides phénoliques ont été les plus touchés par le temps de stockage (6mois) et la température (18-28 et 38 °C). De petits changements dans la teneur en flavonoïdes ont été observés indiquant une stabilité élevée de ces composés lors du stockage. La diminution des polyphénols et de la vitamine C du jus lors du stockage se traduit par la diminution des valeurs de l'activité antioxydante par les tests DPPH et FRAP du jus d'orange. Bien que, une diminution significative de la vitamine C du jus d'orange stocké à 18 °C a été observée, ces jus conservent une qualité appropriée de la teneur en vitamine C et qui est un paramètre normalisé (Klimczak et *al.*, 2007).

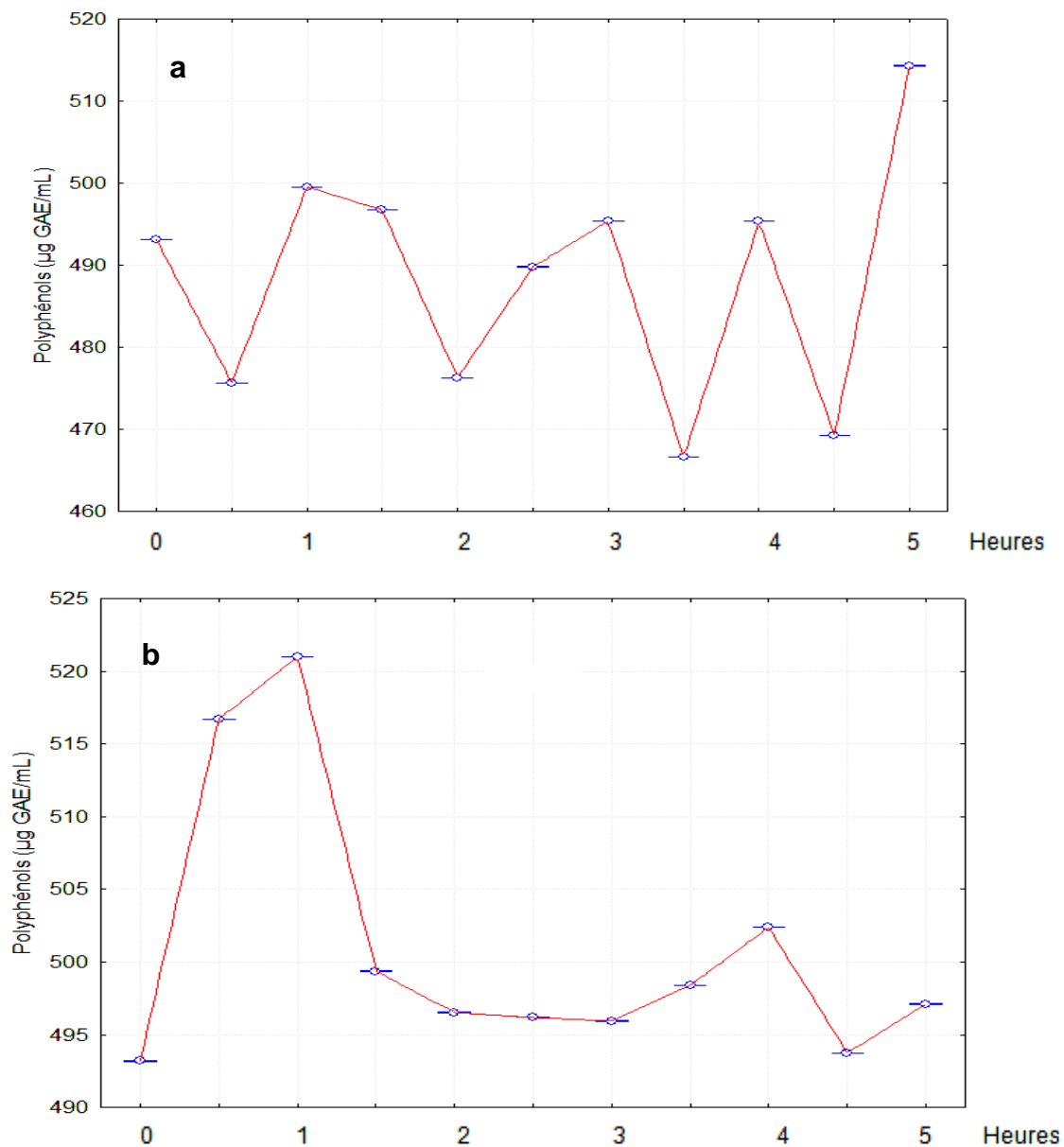
Il a été reporté que les variations des caractéristiques du jus d'orange au cours du stockage ont toujours été plus marquées à 10 °C qu'à 4 °C. Sauf pour le pH, toutes les caractéristiques étudiées (huiles essentielles, acidité, couleur, conductivité, densité, pectine, viscosité et acide ascorbique) varient au cours du temps de stockage à 4 °C et 10 °C, mais la couleur, la densité et la pectine méthyle-estérase ne changent pas significativement à 4 °C. La durée de conservation des jus de fruits en fonction de la durée de vie moyenne de l'acide ascorbique est de 35 jours à 10 °C et 42 jours et plus à 4 °C (Esteve et *al.*, 2005).

Le jus de cladode du figuier de Barbarie doit ainsi être stocké à une température de 4 °C durant 42 jours afin de conserver les propriétés antioxydantes qui s'élèvent durant le stockage à une température de 4 °C et aussi la teneur en vitamines C qui présente un optimum avec cette température et temps de stockage.

6. Effet de la température sur les composants

6.1. Cinétiques de réactions

Afin de déterminer l'impact de la température et du temps de chauffage sur la teneur en polyphénols (fig.54), sur l'activité antioxydante (fig.55) et sur le brunissement (fig.56) du jus de cladode, trois températures du bain-marie ont été choisies 65,80 et 95 °C durant une période de chauffage de 5h.



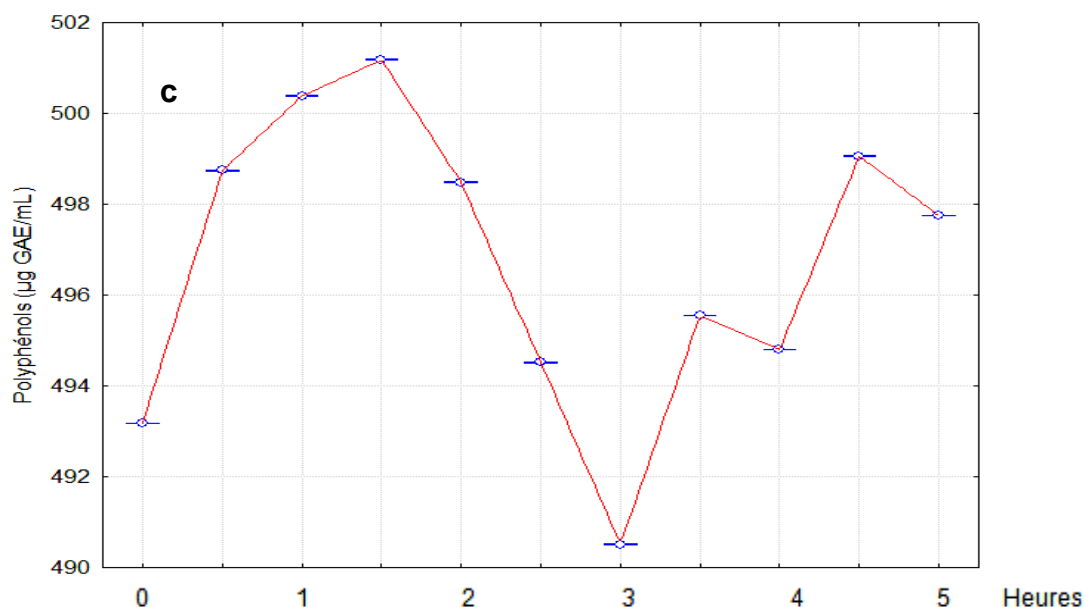


Figure 54 : Effet de la température sur la teneur en polyphénols durant le temps, (a): 65 °C, (b): 80 °C et (c): 95 °C.

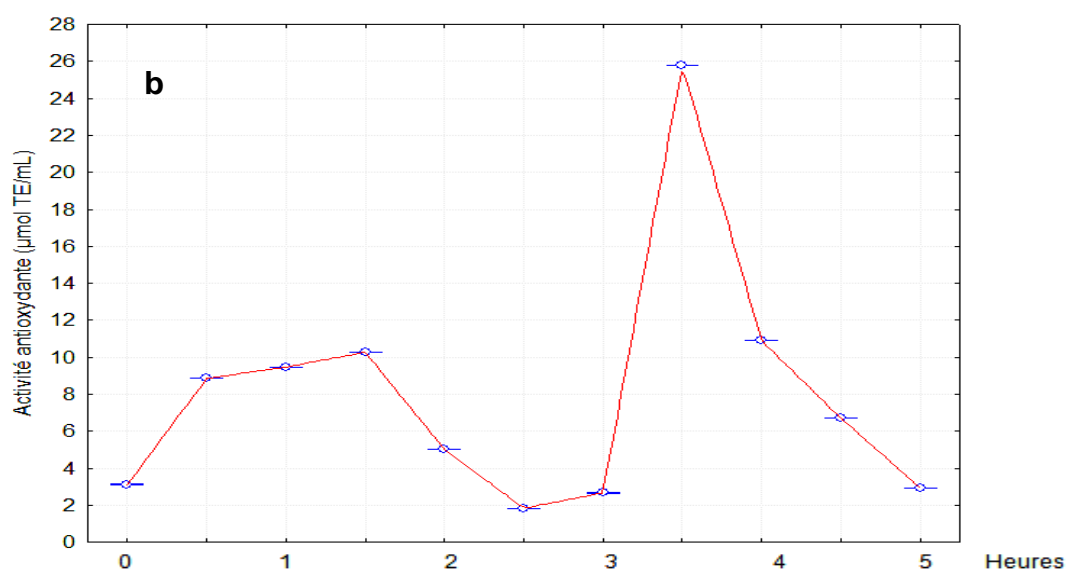
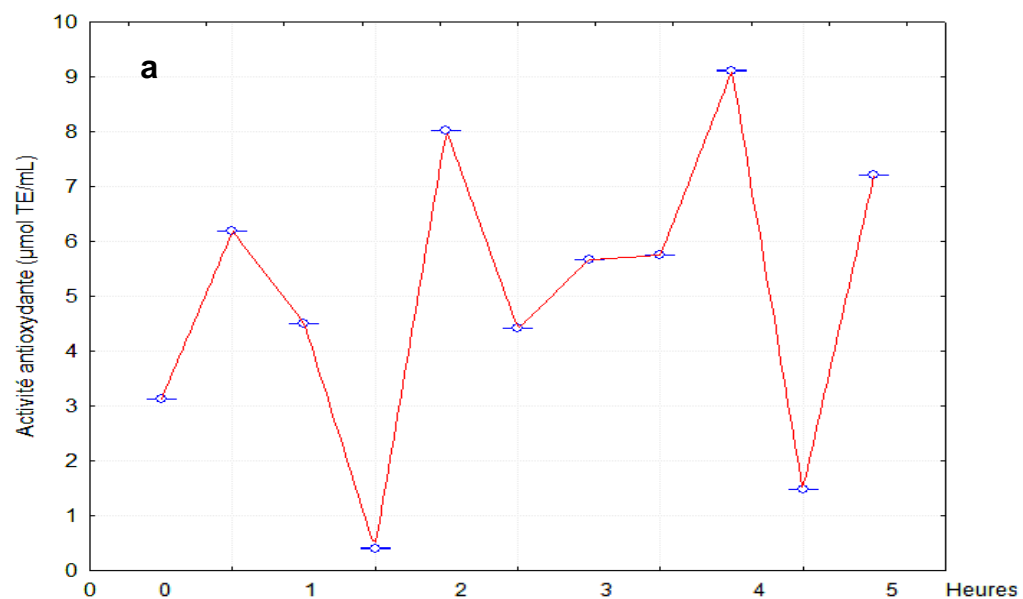
Les mesures ont été effectuées chaque 30 min en utilisant des échantillons indépendants. Les résultats obtenus nous montrent que la teneur en polyphénols varie selon la température et la durée de chauffage. A une température de 65 °C, nous remarquons une fluctuation sur la teneur en polyphénols qui descend un peu et qui remonte à la teneur initiale durant chaque mesure. Pour la température de chauffage de 80 °C, il y'a une petite hausse de la teneur en polyphénols durant la première heure ensuite elle descend vers la valeur initiale à t=0 et commence à se stabiliser. Par contre, à une température de 95 °C nous remarquons que les valeurs sont plus ou moins stables durant le chauffage avec de faibles fluctuations chaque 2h. On peut dire que le chauffage n'influence pas la teneur en polyphénols selon la température.

Il a été reporté que la stabilité des composés phénoliques des feuilles des murs diminue en fonction du temps et de la température et que l'addition de 0,1% (v/v) d'acide formique, ou d'une façon générale la diminution du pH, stabilise les composés phénoliques. De plus, à des températures de chauffage entre 40 et 60 °C, il n'y a pas de changement significatif pour une durée d'incubation de 8h, par contre, à 80 °C il y'a une légère baisse (Katsub et *al.*, 2009).

D'autres recherches ont démontré une relation entre la période de chauffage, la couleur et les polyphénols. Ils ont obtenu une corrélation négative entre la période

de chauffage et la teneur en polyphénols du jus de pomme et de poire (Skorikova et Lyashenko, 1972).

En ce qui concerne l'activité antioxydante, les résultats nous montrent qu'elle varie selon la température et la durée de chauffage. A une température de 65 °C, l'activité antioxydante n'est pas stable et change considérablement durant le chauffage. A 80 °C nous remarquons deux grands pics après 1h30 et après 3h30 de chauffage. A 95 °C l'activité antioxydante reste stable avec quelques faibles fluctuations et après 3h de chauffage, elle monte rapidement pour se stabiliser et redescendre. On peut dire que, durant le chauffage, il y'a une influence significative de la température et de la durée de chauffage.



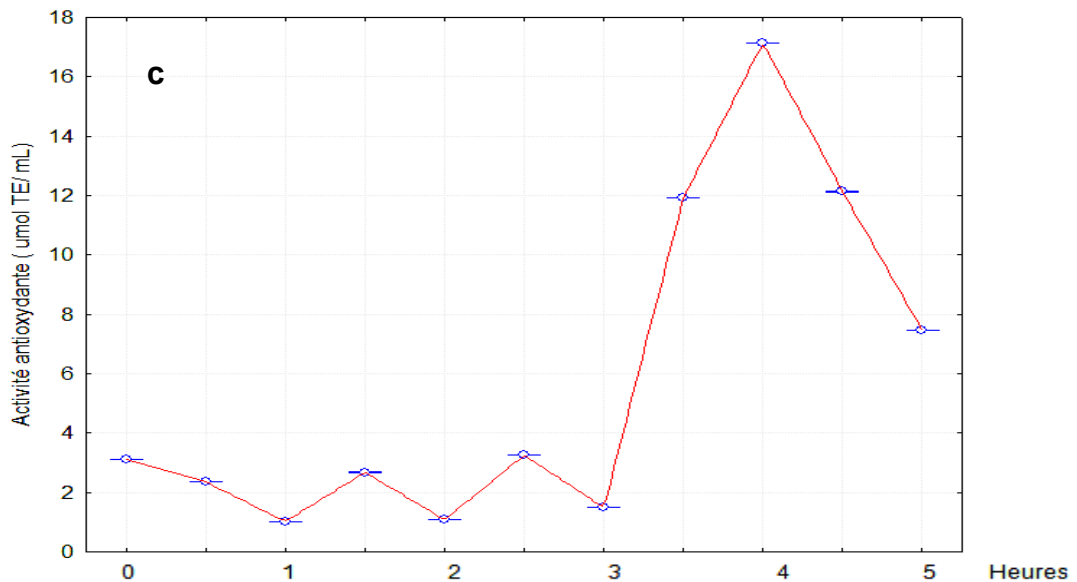


Figure 55 : Effet de la température sur l'activité antioxydante par le test DPPH, (a): 65 °C, (b): 80 °C, (c): 95 °C.

Il est à savoir que les composés bioactifs comme les polyphénols et qui sont associés à l'activité antioxydante des échantillons sont généralement oxydés à des températures élevées (Yoshioka et *al.*, 1990).

On remarque que durant le chauffage après 30 min il y'a une baisse de brunissement avec les trois températures. A 65 °C, le brunissement remonte à sa valeur initiale après 1h et continue à monter faiblement durant le temps, par contre, a 95 °C il remonte rapidement durant le temps. A 80 °C, le brunissement a été faible et diminue durant le temps de chauffage.

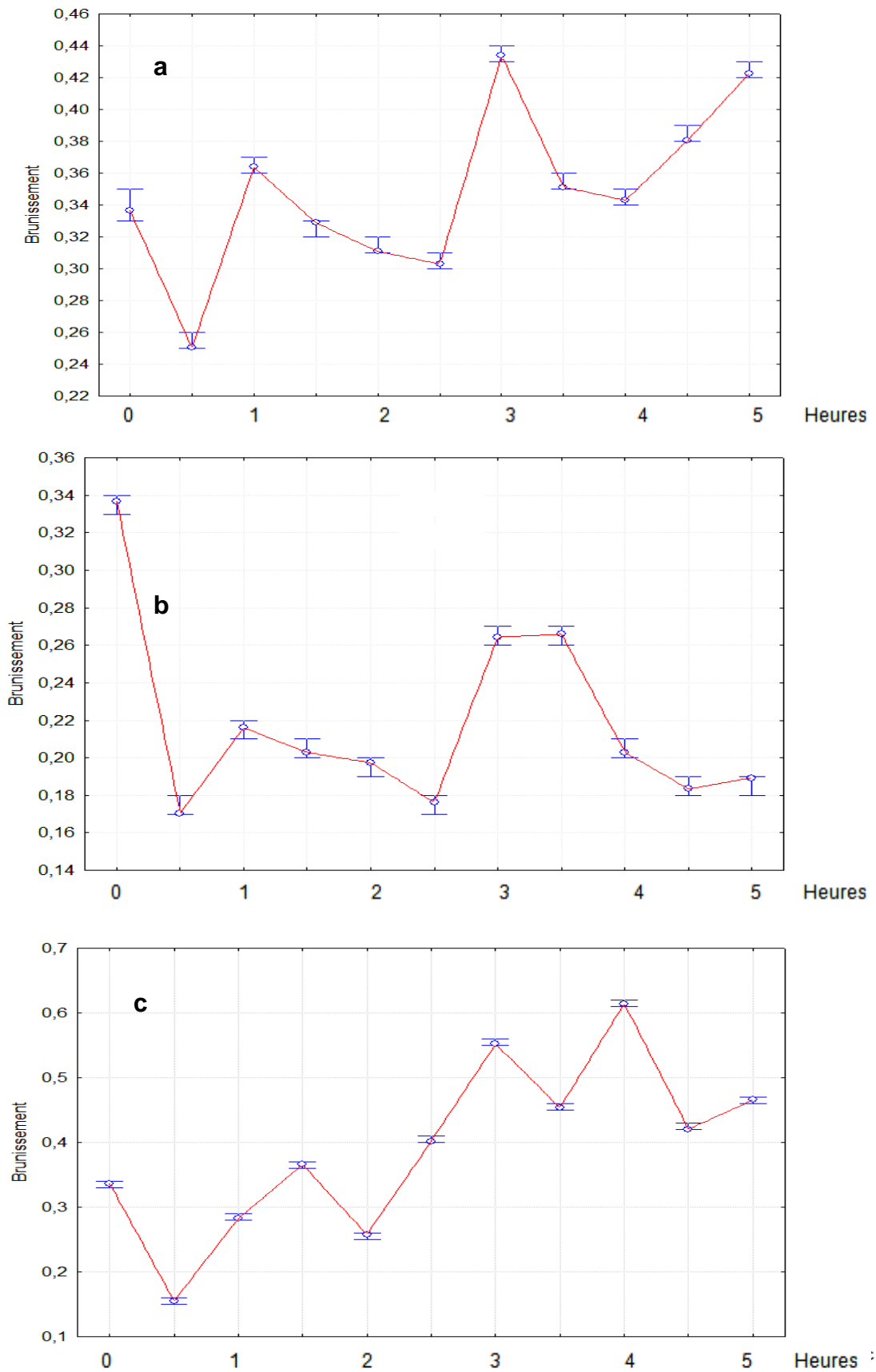


Figure 56 : Effet de la température sur l'indice de brunissement, (a): 65 °C, (b): 80 °C, (c): 95 °C.

6.2. Analyse des cinétiques de réactions

La cinétique de réaction du contenu phénolique, activité antioxydante et le changement de couleur suivent généralement un modèle cinétique d'ordre zéro (équation (1)) ou du premier ordre (équation (2)) (Jaiswal et al., 2012):

$$C = C_0 - kt \quad (1)$$

$$C = C_0 \exp(-kt) \quad (2)$$

Où C représente le paramètre à estimer, l'indice 0 indique la valeur initiale du paramètre t est le temps de chauffage et k est la constante de vitesse à la température t.

L'effet de la température à pression constante sur les constantes de vitesse peuvent être exprimées par l'équation d'Arrhénius, dans laquelle la dépendance en température de k est quantifiée par l'énergie d'activation E_a (kJ / mol) selon l'équation (3), k est la constante de vitesse à la température T, K_{refT} est le taux de la constante de vitesse à la température T_{ref} et R_g est la constante universelle des gaz ($8,314 \times 10^{-3}$ kJ / K mol) (Jaiswal et al., 2012).

$$k = k_{refT} \cdot \exp \left[\frac{-E_a}{R_g} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (3)$$

Afin de vérifier si la constante de vitesse K suit la loi d'Arrhénius, on effectue une régression linéaire de la fonction $\ln K$ en fonction de $1/T$ dont les points doivent être alignés et le coefficient de corrélation r^2 de la régression linéaire est proche de 1 ($>0,99$). Les courbes des essais obtenus sur le jus, à savoir, l'effet de la température sur la teneur en polyphénols, l'activité antioxydante et l'indice de brunissement ne sont ni linéaires ni polynomiaux et par conséquent ne suivent pas un modèle cinétique de 0 ordre ni de premier ordre. Cela a été observé pour le plan d'expérience, les résultats obtenus n'ont pas suivi à leur tour un modèle polynomial. Afin de vérifier visuellement si la constante de vitesse suit la loi d'Arrhénius pour un modèle cinétique de premier ordre, on trace la courbe de $\ln(C/C_{nontraité})$ en fonction du temps (Verbeyst et al., 2010) (fig.57).

Les résultats obtenus pour les trois essais montrent que les points ne sont pas alignés et le coefficient de corrélation r^2 de la régression linéaire est très loin de 1.

Donc, l'effet de la température sur la concentration en polyphénols, sur l'activité antioxydante et sur l'indice de brunissement ne suit pas la loi d'Arrhénius.

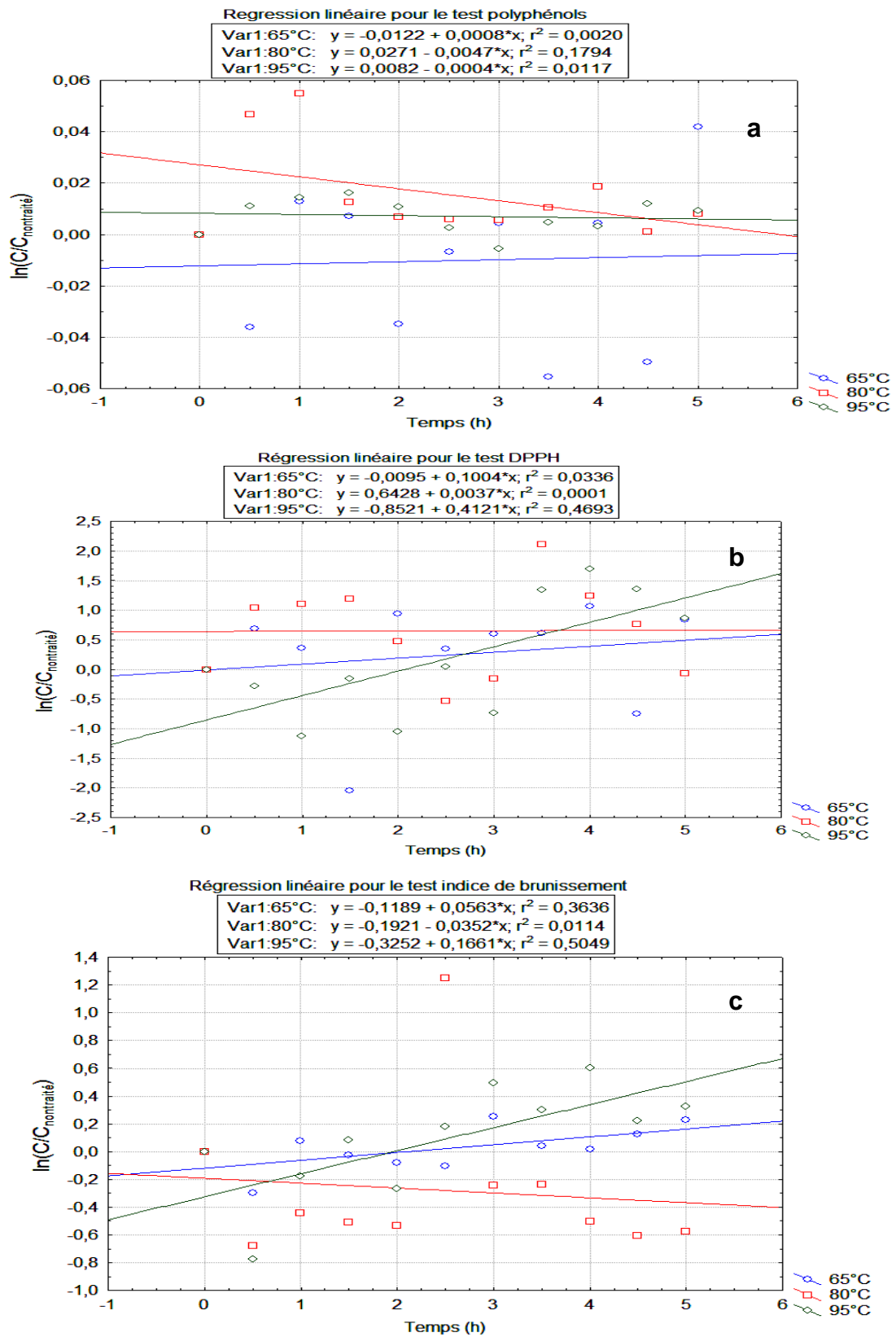


Figure 57 : Régression linéaire, (a) : polyphénols, (b) : DPPH et (c) : indice de brunissement.

4^{EME} PARTIE : Etude préliminaire de valorisation du jus et de ses coproduits

Cette étude est préliminaire et elle a été effectuée en collaboration avec les étudiants IL3 de l'option Transformation Des Fruits de l'ESA. Certains résultats et travaux doivent être repris pour approfondir les travaux.

1. Jus

À partir du jus extrait des cladodes par pressage mécanique, 4 types de jus ont été réalisés (nectar, boisson gazeuse, Kefir et thé glacé). Ils se basent sur trois principes :

- Dilution du jus à 25 % (un quart de jus de cladode et trois quarts d'eau), pour ainsi pouvoir définir le produit comme Bio.
- Abaissement de pH à 3,5 avec de l'acide citrique afin d'inhiber le développement des bactéries.
- Ajout du sucre (50 g.L⁻¹). Après divers tests gustatifs à 25 / 50 / 75 / 100 / 150 g.L⁻¹, une concentration de 50 g.L⁻¹ a été retenue pour un meilleur résultat sur le plan gustatif tout en gardant la saveur du jus.

Ensuite ils ont été soumis à une pasteurisation.

1.1. Nectar

L'arôme coco et l'arôme citron ont été choisis parmi une dizaine d'arômes (20 mL.L⁻¹ + 10 mL.L⁻¹ respectivement), ils se marient bien et donnent un goût assez doux sans pour autant masquer les caractéristiques gustatives du jus de cladode.

1.2. Boisson gazeuse

Une première réalisation avait consisté à ajouter du bicarbonate de sodium par contre une diminution du pH était nécessaire à 2,5 (l'acidité favorise la gazéification). Une boisson peu pétillante et très acide en bouche a été obtenue. Un deuxième essai a été réalisé à partir du jus dilué, auquel une quantité de CO₂ a été ajoutée à l'aide d'un appareil gazéificateur (Soda Stream) et 20g /L de sucre ont dû s'ajouter au jus dilué, car le goût sucré était moins remarqué une fois le gaz rajouté.

1.3. Thé glacé

Le thé glacé ou Ice Tea a été réalisé selon la méthode suivante : 75 cL de thé (infusion de 7 sachets de thé noir earl grey dans 75 cL d'eau chaude) sont ajoutés à

25 cL de jus extrait à partir des cladodes. Ainsi, le goût du thé était bien perceptible sans pour autant masquer celui de la cladode.

1.4. Kéfir

Afin d'obtenir un léger goût pétillant, les grains de Kéfir ont été utilisés (microorganismes fermentant dans des boissons sucrées). Au thé glacé, a été ajouté : 100 g de grains de kéfir, 25 g de sucre et du jus de citron. Ensuite le tout a été laissé fermenté pendant 24 heures. Le kéfir joue un rôle important sur notre santé, il est bénéfique pour la flore intestinale, car il contient des probiotiques et son association avec le jus de cladode du figuier de Barbarie donne un atout supplémentaire comme aliment de santé.

2. Tests de dégustation

Un questionnaire avec trois questions a été rempli par 30 dégustateurs naïfs afin d'avoir une idée sur les appréciations des individus vis-à-vis des jus réalisés.

- **Première question** : « Le meilleur échantillon est le ... », un test par paire, les deux échantillons proposés avaient les caractéristiques indiquées ci-dessous (tabl. 23) :

Tableau 23 : Réponses du test par paire réalisé sur le nectar

N°	Produit	Traitement thermique	Réponses	Effectif Total
888	nectar	Frais	1	
509	nectar	95°C / 3min	18	19

Ces résultats démontrent que le panel qui a réalisé la dégustation préfère largement le nectar pasteurisé.

➤ Test unilatéral de conformité de proportion

$H_0 : P_1 > 0,5$

P_1 : la proportion du panel ayant préféré le nectar pasteurisé.

Un risque de première espèce égal à 5% a été pris.

$$Z_{obs} = \frac{f - P_0}{\frac{\sqrt{P_0(1-P_0)}}{n}} = \frac{0,95 - 0,5}{\sqrt{0,5(1-0,5)}/19} = 0,047$$

$$Z_{théo} = 0,045 < 0,047$$

L'hypothèse H_0 est acceptée au seuil de confiance de 95%.

On peut émettre l'hypothèse que le nectar est plus apprécié après pasteurisation.

- **Deuxième question** : « Quel est l'échantillon différent parmi les trois », les produits proposés pour ce test triangulaire, suivait les caractéristiques indiquées ci-dessous (tabl.24) :

Tableau 24 : Réponse du test triangulaire sur le thé glacé

N°	Produit	Traitement thermique	Réponse	Effectif total
758	Thé glacé	Frais	4	
27	Thé glacé	95°C / 3min	7	
974	Thé glacé	Frais	7	18

On peut dire d'après ces résultats que le panel n'a pas différencié entre le goût du thé glacé pasteurisé et le frais.

➤ Test unilatéral de conformité de proportion

H_0 : $P_1 > 0,33$

P_1 : la proportion du panel ayant déterminé que le thé glacé a eu un traitement thermique différent des deux autres.

Un risque de première espèce égal à 5% a été pris.

$$Z_{obs} = \frac{f - P_0}{\frac{\sqrt{P_0(1-P_0)}}{n}} = \frac{0,39 - 0,33}{\sqrt{0,33(1-0,33)}/18} = 0,0071$$

$$Z_{théo} = 0,045 \gg Z_{obs}$$

L'hypothèse H_0 est rejetée au risque de 5%. On peut émettre l'hypothèse que la pasteurisation du thé glacé ne modifie pas le goût.

D'après ces résultats, on peut dire que la pasteurisation peut engendrer des variations de goût sur les produits réalisés à partir du jus de cladode du figuier

Barbarie. De plus, sur certains produits comme le nectar, la pasteurisation pourrait avoir un effet plutôt positif sur le goût. Néanmoins, étant donné le faible nombre des personnes du panel, ces résultats restent théoriques.

- **Troisième question** : « Entourez une appréciation », les résultats des boissons dégustées dans ce test hédonique sont représentés dans le tableau 25.

Tableau 25 : Résultats du test évaluant l'appréciation des produits

N°	Produit	Extrêmement désagréable	Très désagréable	Désagréable	Agréable	Très agréable	Extrêmement Agréable	Effectif
902	Kéfir	0 %	24%	24%	35%	12 %	6%	17
276	Nectar	22%	50%	17%	6%	6%	0%	18
338	Thé glacé	5%	10%	50%	35%	0%	0%	20
673	Boisson gazeuse	0%	5%	30%	40%	20%	5%	20

La boisson gazeuse et le kéfir semblent avoir été relativement appréciés puisqu'ils obtiennent réciproquement 63 % et 52 % d'opinions favorables (fig. 58 et 61).

Kéfir

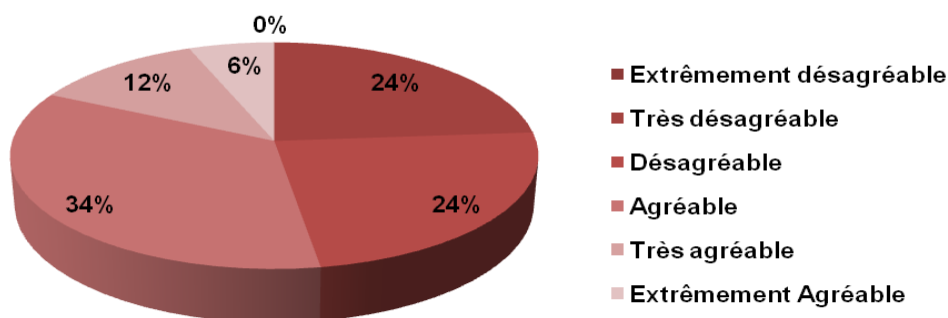


Figure 58 : Graphique à secteur de l'appréciation du kéfir

Le nectar est très peu apprécié, avec seulement 12 % de résultats favorables et 0 % de personnes l'ayant trouvé « extrêmement agréable » (fig.59).

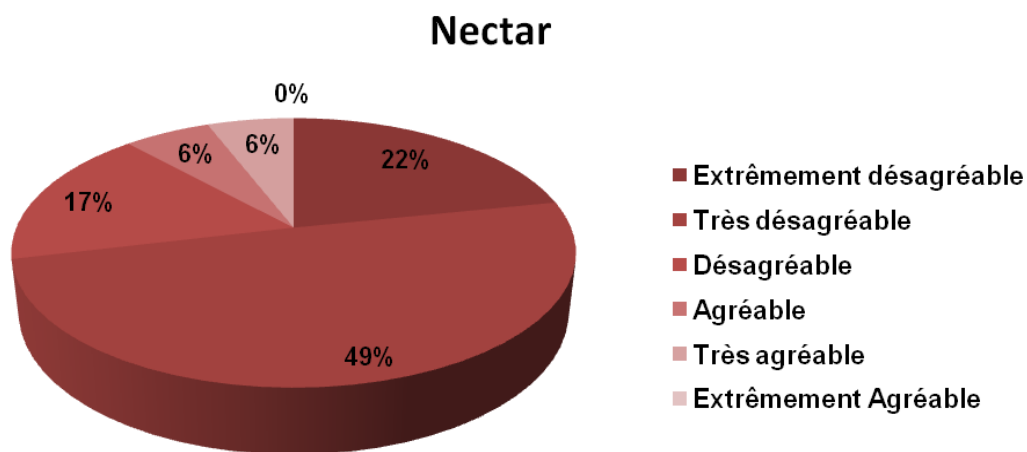


Figure 59 : Graphique à secteur de l'appréciation du nectar

En ce qui concerne le thé glacé, un tiers des personnes du panel interrogé le trouve « agréable » et 0 % le trouve « très agréable » ou « extrêmement agréable » (fig. 60).

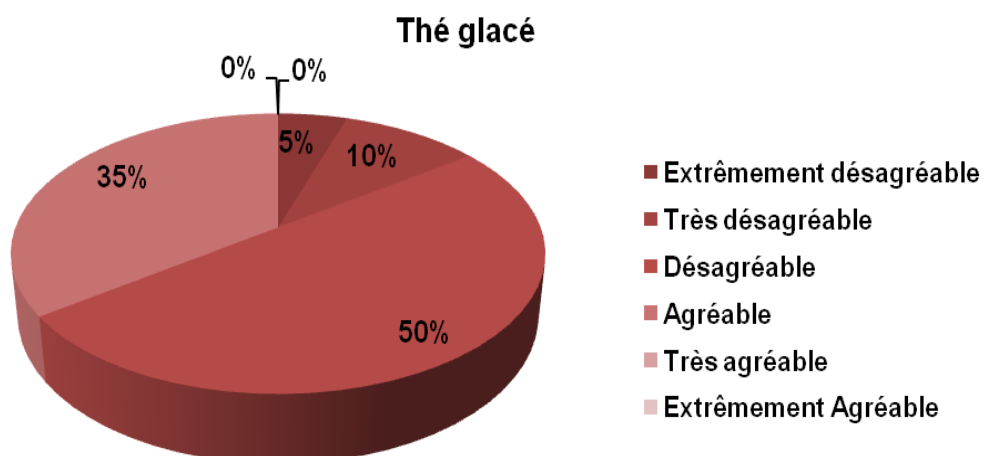


Figure 60 : Graphique à secteur de l'appréciation du thé glacé

La boisson gazeuse, avec deux tiers d'opinions favorables, semble être la boisson la plus appréciée. De plus, un quart des personnes interrogées déclare qu'il est « très agréable » ou « extrêmement agréable » (fig.61).

Boisson gazeuse

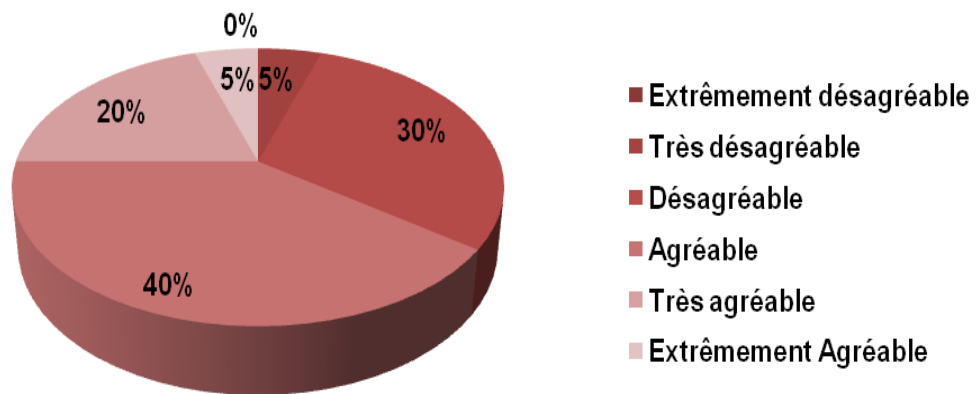


Figure 61 : Graphique à secteur de l'appréciation de la boisson gazeuse

D'après ces résultats, il semble que le produit d'origine qui est le nectar n'est pas vraiment apprécié, son goût caractéristique nécessite une adaptation gustative durant le temps. Afin d'atténuer le goût, diverses préparations ont été faites (thé glacé, boissons gazeuse et le kéfir) et ont donné de bons résultats; par contre, il est fort probable que ces résultats soient en partie dus à l'effet contraste avec les autres boissons très peu appréciées.

3. Coproduits

Après le pressage des cladodes pour en extraire le jus, il reste une quantité importante de résidus (peau et pulpe) épais et riches en nutriments. Une gamme importante de coproduits a été réalisée : légume, chips, farine, confiture et soupe.

3.1. Cuisson

Les coproduits ont été cuisinés comme des haricots, c'est une recette très utilisée au Mexique. Pour cela, 300 g de coproduits ont été mis à bouillir dans une casserole dont l'eau a été changée 3 fois avec filtration avec une passoire entre chaque renouvellement. Ce procédé devait permettre, par dissolution des sucres de la pulpe, de diminuer la sensation de visqueux et de gluant à laquelle notre culture culinaire n'est pas habituée. Le résultat est peu concluant : le visqueux est toujours présent et la peau, ayant une rigidité proche du plastique, est difficile à mâcher.

3.2. Chips

Une purée issue des coproduits du jus de cladode a été obtenue après un mixage, ensuite elle a été finement étalée (2 mm d'épaisseur) sur du papier sulfurisé afin de la faire sécher pour obtenir des chips. Après une mise à l'étuve (100°C) pendant 24h, un produit croustillant et assez filandreux a été obtenu ayant un goût de foin prononcé. Un assaisonnement d'épices et de sel est indispensable.

3.3. Farine

Afin d'obtenir une farine, une purée des coproduits, des cladodes ont été étalées sur du papier sulfurisé et mise à l'étuve (100°C) durant 24h, la purée une fois devenue sèche a été broyée. Cette farine peut être incorporée à des gâteaux ou comme complément alimentaire riche en fibres (fig.62)

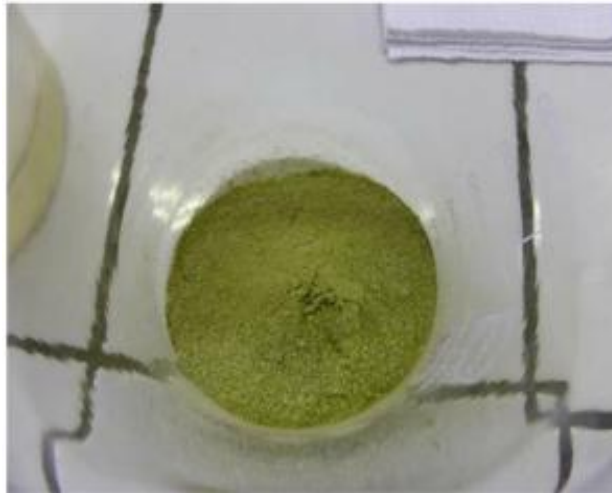


Figure 62 : Farine obtenue à partir de la purée des coproduits des cladodes

3.4. Confiture

À partir d'une purée de cladode, une confiture aromatisée a été réalisée afin de masquer le goût peu agréable (haricot vert). Un mélange a été mis sous feu doux et qui est constitué de : 150 g de purée, 150 g de sucre, 35 mL de jus de citron, 4 g d'arôme vanille, 25 mL d'eau et 60 mL de jus de cassis qui permet à la fois d'aromatiser et de colorer la confiture. Deux types de confiture ont été réalisés : une à partir des morceaux entiers issus après pressage des cladodes et une autre avec la pulpe uniquement (fig.63). La première version de confiture garde de petits bouts avec une peau rigide malgré le mixage et la deuxième développe une viscosité plus marquée, mais qui est naturelle pour une confiture.



Figure 63 : Confiture obtenue à partir des coproduits des cladodes.

3.5. Soupe

Les cladodes ont une saveur et une odeur de légume vert (haricot, petit pois), ce parfum a été valorisé dans une soupe épicée. Une purée de 250 g de coproduits mixé a été mélangée avec 250 mL d'eau pour la diluer, ensuite 20 g de farine a été ajouté pour épaissir et donner un côté velouté. Enfin, un assaisonnement a été ajouté constitué de sel, poivre, thym, sauge et laurier.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les terres arides au Maroc s'étendent sur une superficie dépassant 33 millions d'hectares et qui sont en expansion à cause du réchauffement climatique. Ces zones contribuent à la subsistance de milliers de ruraux à faibles revenus et protègent le pays contre la désertification. Le figuier de Barbarie est un cactus qui a l'aptitude de vivre avec une faible quantité d'eau et de supporter une longue période de sécheresse. Une valorisation de cette plante et plus précisément la formulation d'un nouveau jus extrait à partir de ses cladodes contribuera au développement des zones arides par la création d'entreprises et d'emplois

Les deux espèces du figuier de Barbarie *Opuntia ficus-indica* (sans épines) et *Opuntia megacantha* (avec des épines) ont fait l'objet d'étude de cette thèse. Les cladodes ont été récoltés dans la région d'Ouled Dlim située au Nord-Ouest de la ville de Marrakech au Maroc durant trois saisons (printemps, été et hiver). Les dimensions des cladodes ont été choisies selon des mesures bien définies afin d'avoir un bon intérêt nutritionnel : la longueur entre 15 et 25 cm et la largeur entre 9 et 13 cm.

Le rendement en jus issu à partir d'un broyage et centrifugation varie selon les espèces et les saisons (63,39% – 20,83%). La pluie est la seule source d'eau pour ces plantes, ainsi, elle influence leurs capacités à stocker de l'eau. Les cladodes récoltés au mois de mars ont donné le plus haut rendement, ensuite viennent celles de l'hiver au mois de janvier et enfin les cladodes de l'été au mois d'août. L'espèce épineuse est plus riche en eau grâce à ses épines qui réduisent la surface d'exposition au soleil. La teneur en eau ($95,68 \pm 0,07$ – $91,00 \pm 0,26$ g /100g) et les cendres ($1,74 \pm 0,04$ et $0,75 \pm 0,01$ g /100 g) sont inversement proportionnelles, tel que : les cladodes du mois de mars qui ont eu la plus grande teneur en eau ont enregistré la plus petite teneur en cendre. La même remarque a été observée pour le degré Brix et l'acidité titrable. Le pH varie entre 4,49 et 4,77 et par conséquent le jus à une acidité moyenne.

L'analyse chimique du jus des deux espèces durant les trois saisons a donné la teneur des composants essentiels pour avoir une caractérisation globale du jus. Les analyses effectuées sont : teneur en polyphénols (456 ± 8 – 543 ± 1 µg EGA /mL), flavonoïdes ($1,36 \pm 0,04$ – $1,18 \pm 0,01$ mg / 100 mL), protéines ($0,18 \pm 0,02$ – $0,50 \pm 0,04$ g /100 mL), sucres ($1,45 \pm 0,03$ – $0,66 \pm 0,01$ g /100 mL), pectines ($0,10 \pm 0,01$ – $2,25 \pm 0,03$ %), tannins condensés ($1,36 \pm 0,15$ – $1,24 \pm 0,21$ mg

/100 mL), tannins hydrosolubles ($18,23 \pm 0,36 - 12,10 \pm 0,21$) et acide ascorbique ($17,60 \pm 1,87 - 22,88 \pm 0,62$ mg /100 mL). L'analyse des minéraux a concerné les macroéléments suivants: calcium, potassium, magnésium et sodium. Le jus est riche en potassium, sa teneur a atteint 409,35 mg /100 mL en août et plus précisément l'espèce épineuse. Le calcium vient en deuxième place, par contre, le jus est pauvre en magnésium et en sodium. Les jus extraits à partir des cladodes épineuses du mois d'août ont été les plus riches en ces composants. La teneur en polyphénols et en acide ascorbique est assez élevée, mais la teneur en sucres est faible, ainsi, on peut définir le jus comme un aliment faible en calories (27 kcal /100 g), par conséquent, il sera conseillé pour les gens qui souffrent d'obésité. L'analyse qualitative des acides organiques a donné des résultats sur les temps de rétention des standards, mais elle nécessite des améliorations. L'analyse quantitative des polyphénols du jus de cladode du mois de mars par HPLC-DAD a montré la présence d'une quantité importante de flavonoïdes essentiellement l'isoquercétine et hyperoside qui ont des effets bénéfiques sur la santé.

Afin de valoriser le jus, une analyse qui prend de plus en plus d'ampleur dans le monde médical et cosmétique a été réalisée et qui est l'activité antioxydante et antiradicalaire *in vitro*. Le pouvoir des antioxydants naturels du jus à piéger les radicaux libres a été testé selon trois méthodes : DPPH, FRAP et ABTS. Ce sont des méthodes qui nous ont permis en premier lieu de classer les différents jus obtenus à partir des deux espèces durant les trois saisons. Les résultats obtenus ont montré que le jus obtenu à partir des cladodes épineuses du mois d'août a la plus grande activité antioxydante : $4,10 \pm 0,02$ $\mu\text{mol TE/mL}$ (DPPH), $3,33 \pm 0,03$ $\mu\text{mol TE/mL}$ (FRAP), $23,10 \pm 0,17$ $\mu\text{mol TE/mL}$ (ABTS). Les résultats avec les méthodes DPPH et FRAP ont été presque similaires par contre avec le test ABTS les valeurs étaient élevées, cependant, la réaction se fait principalement par transfert d'atomes d'hydrogène que par transfert d'électrons et ce sont les propriétés des polyphénols comme donneurs de protons H^+ .

Le jus extrait à partir des cladodes récoltées au mois d'août nous a donné les plus grandes valeurs en composants biochimiques ainsi que pour l'activité antioxydante et antiradicalaire *in vitro*. Dans des conditions de stress, les métabolites secondaires et principalement les polyphénols augmentent et en particulier les flavonoïdes. Les métabolites primaires ont augmenté à leurs tours durant cette période. Le jus extrait des cladodes épineuses nous a donné des valeurs plus

élevées, car dans des conditions de stress, les cladodes inermes peuvent commencer à développer des épines et donc *Opuntia megacantha* est plus adaptée aux conditions climatiques arides, ainsi, la production des métabolites primaires et secondaires est plus élevée par rapport à *Opuntia ficus-indica*.

Le jus de cladode soumis à un traitement thermique a montré une grande variabilité en ses composants. Un plan d'expérience qui fait appel à la méthodologie de la surface de réponse (plan factoriel complet 2^3 avec six axes et 5 points centraux) a été utilisé pour optimiser les conditions expérimentales de pasteurisation du jus en analysant l'influence de trois facteurs indépendants : pH (X_1), température (X_2) et temps (X_3) et les facteurs dépendants (réponses) : polyphénols (Y_1), flavonoïdes (Y_2) et l'activité antioxydante (Y_3). Les résultats obtenus ont montré que les cinétiques de réaction ne suivent pas un modèle polynomial de second ordre. La cinétique de réaction des teneurs en polyphénols, activité antioxydante, flavonoïdes et de l'indice de brunissement suivant un temps (5h) et une température de chauffage (65, 80 et 95 °C) ne suit ni un modèle linéaire ni logarithmique. Ainsi, les équations d'Arrhenius ne peuvent pas être appliquées. Une analyse plus approfondie sur le comportement du jus vis-à-vis de la chaleur est nécessaire afin d'expliquer ces résultats.

L'analyse microbiologique du jus de cladode a montré l'effet de la température, du temps de chauffage et du pH sur la stabilité microbiologique du jus. Il est nécessaire d'avoir une température élevée et un pH bas afin d'assurer une bonne qualité sanitaire. Le jus de cladode peut être ainsi conservé par une pasteurisation à 95 °C durant 3 min à un pH de 3,5 afin d'inhiber le développement des micro-organismes pathogènes et inactiver la PME et la POD qui sont responsables respectivement de la présence de turbidité dans le jus et du changement de couleur. Au niveau industriel, la flash pasteurisation (90 °C - 2s ou 84 °C - 20s) est l'outil idéal pour conserver les propriétés nutritives du jus et assurer en même temps sa stabilité microbiologique avec un conditionnement sous azote.

Le jus peut être aussi conservé par stérilisation. Il sera 100% naturel, car le pH ne va pas être modifié avec l'ajout d'autres composants.

Afin de déterminer le temps de stockage idéal qui permet une bonne conservation des éléments nutritifs (teneur en polyphénols, activité antioxydante et indice de

brunissement), le jus pasteurisé a été soumis à un stockage à différentes températures (4 °C, 20 °C, 35 °C et 45 °C) durant 6 semaines. Les teneurs en polyphénols ont augmenté après la pasteurisation et elles sont restées plus au moins stables durant le stockage, le brunissement a baissé durant le temps et l'activité antioxydante a augmenté d'une façon logarithmique à 4 °C. Ainsi, le jus de cladode du figuier de Barbarie doit être stocké à une température de 4 °C durant 42 jours (DLUO) afin de conserver les propriétés antioxydantes qui s'élèvent durant le stockage à une température de 4 °C.

Le présent travail nous a permis de réaliser une nouvelle base de données sur le jus de cladode et son utilisation. Il touche trois grands secteurs : agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Ainsi, les cladodes du figuier de Barbarie constituent une matière première aux multiples usages.

Les perspectives qu'on peut envisager sont les suivantes :

- Identifier les polysaccharides présents dans le jus cladode. Une faible teneur en sucre engendre un faible apport en calorie donc le jus sera conseillé pour les diabètes et aussi pour remédier au problème de l'obésité.
- Finaliser les analyses biochimiques : analyse qualitative des acides organiques et des acides aminés du jus de cladode.
- Analyser de nouveaux flavonoïdes qui ont de grandes propriétés pharmacologiques vu que le jus de cladode a donné de grandes concentrations en flavonoïdes.
- Valoriser le jus de cladode sous forme de poudre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABID M., JABBAR S., WU T., MUHAMMAD HASHIM M., HU B., LEI S., ZENG X. Sonication enhances polyphenolic compound, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, 21, 93–97
- ABIDI S., BEN SALEM H., VASTA V., PRIOLO, A. Supplementation with barley or spineless cactus (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) cladodes on digestion, growth and intramuscular fatty acid composition in sheep and goats receiving oaten hay. *Small Rumin. Res.*, 2009, 87, 9–16.
- ADAMS M.R., MOSS M.O. *Food Microbiology*. The Royal Society Of Chemistry, Cambridge, 1995, p. 156-251.
- AKHTAR S., ALI KHAN F., ALI J., JAVID B. Nutritional Composition, Sensory Evaluation and Quality Assessment of Different Brands of Commercial Tetra Pack Apple Juices Available in Local Market of Peshawar Pakistan. *Global Journal of Biotech. and Biochem.*, 2013, 8, 69-73.
- ALVAREZ J., PASTORIZA S., ALONSO-OLALLA R., DELGADO-ANDRADE C., RUFÍAN-HENARES J.A. Nutritional and physicochemical characteristic of commercial Spanish citrus juices. *Food Chemistry*, 2014, 164, 396-405.
- ANDERSON E. F. *The Cactus Family*, Timber Press, Portland, 2001, p. 15–72.
- ARBA M. Le cactus *Opuntia*, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc. *Sym. Inter. Agriculture durable en région Méditerranéenne (ADUMED)*, 2009, p. 215-222.
- ARNI-MANCHADO P., CHEYNIER V. Les polyphénols en agroalimentaire. *Coll. Sciences et technique agroalimentaires*, 2006, p. 1-109.
- ARTS M. J. T. J., HAENEN G. R. M. M., WILMS L C, BEETSTRA S. A. J. N., HEIJNEN C. G. M., VOSS H. P., BAST A. Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 50, 1184-1187.
- ÁVILA-CURIEL A., SHAMAH-LEVY T., CHAVEZ-VILLASANA A., GALINDO-GOMEZ C. Encuesta urbana de alimentación y nutrición en la zona metropolitana de la ciudad de México 2002. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán e Instituto de Salud Pública, México, 2003.

- BAKER R. A., CAMERON R. G. Clouds of citrus juices and juice drinks. *FoodTechnology*, 1999, 53, 64–69.
- BALASUNDRAM N., SUNDRAM K., SAMMAN S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006, 99, 191–203.
- BARON A. Quelques emplois de polyosidases dans l'industrie des fruits et légumes. *Liquéfaction et Macération*. Technique, 1990.
- BARRECA D., BELLOCCO E., CARISTI C., LEUZZI U., GATTUSO G. Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice. *Food Chemistry*, 2011, 129, 417-422.
- BAUR J.A., SINCLAIR D.A. Therapeutic potential of resveratrol: in the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, 5, 493-506.
- BELYAGOUBI N. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat, 2001, p. 34-35.
- BENSADÓN S., HERVERT-HERNÁNDEZ D., SÁYAGO-AYERDI S.G., GOÑI I. By-Products of *Opuntia ficus-indica* as a Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Plant Foods Hum Nutr.*, 2010, 65,210–216.
- BEN-THLIJA, A. Nutritional value of several *Opuntia* species. Master Thesis, Oregon State University, Corvallis/USA, 1987; cit. in: Nefzaoui, A., Ben Salem, H., Forage, fodder, and animal nutrition, in: Nobel, P. S. (Ed.), *Cacti. Biology and Uses*, University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, 2002, p. 199–210.
- BENZIE F.F., STRAIN J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239, 70-76.
- BERNILET C. Etude de l'influence de l'emballage et de la matrice sur la qualité du jus d'orange. Thèse en sciences alimentaires, Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires (ENSIA), p 107.
- BHOOSHAN PANDEY K., RIVZI S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.*, 2009, 2(5), 270–278.
- BLOOR SJ. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Methods Enzymol*, 2001, 3, 314-335.

- BOUTAKIOUT¹ A., ELOTHMANI D., MAHROUZ M., HANINE H. Effect of seasons on proximate composition of cladode juice of two species of *cactaceae*. International Journal of Technology Enhancements And Emerging Engineering Research, 2015, 1 (03), 1-8.
- BOUTAKIOUT² A., ELOTHMANI D., MAHROUZ M., HMID I., HANINE H. Phytochemical constituents and in vitro radical scavenging activity of different cladodes juice of *cactacea* cultivars from different areas in Morocco. International Journal of Technology Enhancements And Emerging Engineering Research, 2015, 1 (03), 56-66.
- BRAESCOA V., GAUTHIER T., BELLISLE F. Fruit juices and fruit nectars. Cahiers de nutrition et de diététique, 2013, 48, 248-256.
- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M.E., BERSET C. Use of a free Radical .Method to evaluate antioxidant activity. Lebensm.-Wiss.u-Technol., 1995, 28, 25-30.
- BRITTON N.L., ROSE J.N. The Cactaceae, 1963, Vol. 1 & 2.
- BRUCKNER H., WESTHAUSER T. Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. Amino Acids, 2003, 24, 43–55.
- BUGGEY L.A. A review of polyphenolic antioxidants in hops, brewing and beer. The brewer international, 2001, 4, 21-25.
- CANO A., ACOSTA, M., ARNAO, M. B. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. Redox Report, 2000, 5, 365-370.
- CANO A., ALCARAZ, O., ACOSTA, M., ARNAO, M. B. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS•+assay. Redox Report, 2002, 7, 103-109.
- CASTANEDA-OVANDO A., PACHECO-HERNANDEZ M. D. L., PAEZ-HERNÁNDEZ M. E., RODRIGUEZ J. A., GALAN-VIDAL C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 2009 113(4), 859-871.
- CHEONG M.W., LIUA S.Q., ZHOUA W., CURRANB P., YU B. Chemical composition and sensory profile of pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) juice. Food Chemistry, 2012, 135, 2505–2513.
- CLIFFORD M.N. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. J.Sci. Food Agric., 2000, 80, 1063-1072.

- COLLIN S., CROUZET J. Polyphénols et procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Agence universitaire de la francophonie, Edition Lavoisier, 2011, p.1-300.
- COUNET C., COLLIN S. Effect of the number of flavonol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *J. Agric. Food. Chem.*, 2003, 51, 6816-6822.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curent Opinion in Biotechnology*, 2012 23(2), 174-181.
- DELATTRE J. J., BEAUDEUX L., BONNEFONT D., ROUSSELOT L. Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Editions médicales Internationales, 2005, 1- 108.
- DELMAS D., JANNIN B., LATRUFFE N. Resveratrol: preventinf properties against vascular alteractions and ageing. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2005, 49, 377-395.
- DI MAJO D., GIAMMANCO M., LA GUARDIA M., TRIPOLI E., GIAMMANCO S., FINOTTI E. Flavanones in citrus fruit: structure-antioxidant activity relationships. *Food Research International* 38, 2005, 1161–1166.
- DONOVAN J.L., MANACH C., RIOS L., MORAND C., SCALBERT A., REMESY C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed as ingle meal containing a grape seed extract or the procyanidin dimer B3. *Br. J. Nutr.* 2002, 87, 299–306.
- DOS SANTOS LIMA M., DE SOUZA VERAS SILANI I., MAIA TOALDO I., CLAUDIO CORRÊA L., CAMARÃO TELLES BIASOTO L., ELIAS PEREIRA G., BORDIGNON-LUIZ M.T., J.L. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chem.*, 2014, 161, 94-103.
- DOUCE R. Les plantes supérieures : divines et/ou diaboliques. Conférences et débats sur les grands défis du 21^e siècle. Paris : Institut de France, Académie des Sciences. 2005.
- DRILLEAU J. F. Cidre, jus de pomme et concentrés." In R. Scriban : Les industries agricoles et alimentaires : progrès des sciences et des techniques.(Tec et Doc Lavoisier, Paris), 1988, p. 137-153.
- DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 1965, 28, 350-356

- EL GHARRAS, H. Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 2009, 44(12), 2512-2518.
- EL-MOSTAFA K., EL KHARRASSI Y., BADREDDINE A., ANDREOLETTI P., VAMECQ J., EL KEBBAJ M.S., LATRUFFE N., LIZARD G., NASSER B., CHERKAOUI-MALKI M. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules*, 2014, 19, 14879-14901.
- ERLUND I., KOSONEN T., ALFTHAN G. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2000, 56, 545–53.
- ESHUN K., HE Q. Aloe vera: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries – a review. *Crit. Rev. FoodSci. Nutr*, 2004, 44, 91–96.
- ESTEVE M.J., FRIGOLA A., RODRIGO C. Effect of storage period under variable conditions on the chemical and physical composition and colour of Spanish refrigerated orange juices. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43, 1413–1422.
- FAVIER A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 2003, p. 108-115.
- FERNANDEZ M.L., TREJO A., MCNAMARA D.J. Pectin isolated From Prickly pear (*Opuntia* sp) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol-fed guinea pigs. *J. Nutr.*, 1990, 120, 1283-1290.
- FERNANDEZ-LOPEZ J.A., ALMELA L., OBON J.M., CASTELLAR R. Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2010, 65, 253–259.
- FRATI A.C., GORDILLO B.E., ALTAMIRANO P., ARIZA C.R. Hypoglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lemaire in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care*, 1988, 11, 63-66.
- GARDES-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z., D. JORE. Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 2003, 91-96.
- GEBHARDT R. Variable influence of kaempferol and myricetin on in vitro hepato cellular cholesterol biosynthesis. *Planta Med*, 2003, 69, 1071–1074.

- GINESTRA G., PARKER M.L., BENNETT R.N., ROBERTSON J., MANDALARI G., NARBARD A., LO CURTO R.B., BISIGNANO G., FAULDS C.B., WALDRON K.W. Anatomical, chemical, and biochemical Characterization of cladodes from Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). *J. Agric. Food. Chem.* 2009, 57, 10323-10330.
- GOLDSTEIN G., ANDRADE L., NOBEL P. Differences in Water Relations Parameters from the Chlorenchyma and the Parenchyma of the *Opuntia ficus-indica* under Wet versus Dry Conditions. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 1991, 18(2), 95-107.
- GOMMES R., EL HAIRECH T., ROSILLON D., BALAGHI R. Impact of climat change on agricultural yields in Morocco. FAO. Roma, Italy., 2009, p.105.
- GRAEFE E.U., WITTIG J., MUELLER S. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J. Clin. Pharmacol.*, 2001,41, 492–9.
- GRIESSERA M., WEINGART G., SCHOEDL-HUMMEL K., NEUMANN N., BECKER M., VARMUZAD, LIEBNER K.F., SCHUHMACHER R., FORNECK A. Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 88, 17-26.
- GUEVARA-FIGUEROA T., JIMENEZ-ISLAS H., REYES-ESCOGIDO M.L., MORTENSEN A. G., LAURSENC B.B., LIN L., LEON-RODRIGUEZ A., FOMSGAARD I.S., BARBA DE LA ROSA A.P. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, 23, 525–532.
- GUEVARA J. C., YAHIA E. M., BRITO DE LA FUENTE E. Modified atmosphere packaging of prickly pear cactus stems (*Opuntia* spp.). *Lebensm. Wiss. Technol.*, 2001, 34, 445–451.
- HADJ SADOK T., AID F., BELLAL M., STELA M., HUSSAIN A. Composition chimique des jeunes cladodes d'opuntia ficus indica et possibilités de valorisation alimentaire. *Agricultura*, 2008, 1(2),65-66.
- HALLIWEL B. How to characterise a biological antioxidant, *Free Radic. Res. Commun.*, 1990, p. 1-32.
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn. Oxford: Clarendon Press, 1999.
- HART J.H. Role of phytoestrogens in decay and disease resistance. *Ann Rev. Phytopathol.*, 1981, 19, 437-458.

- HEGWOOD D. Human health discoveries with *Opuntia* sp. (prickly pear). Hort. Sc., 1994, 25, 1515–1516.
- HERNÁNDEZ-URBIOLA M.I., PÉREZ-TORRERO E., RODRÍGUEZ-GARCÍA M.E. Chemical Analysis of Nutritional Content of Prickly Pads (*Opuntia ficus indica*) at Varied Ages in an Organic Harvest. Int. J. Environ. Res. Public Health, 2011, 8, 1287-1295.
- HOLLMAN P.C.H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects. J. Sci. Food Agric., 2001, 81, 842-852.
- HUANG D., OU B., PRIOR R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53, 1841-1856.
- JAISWAL A.K., GUPTA S., ABU-GHANNAM N. Kinetic evaluation of colour, texture, polyphenols and antioxidant capacity of Irish York cabbage after blanching treatment. Food Chemistry, 2012, 131, 63–72.
- JANG D.S., KANG B.S., RYU S.Y., CHANG I.M., MIN K.R., KIM Y. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. Biochem. Pharmacol., 1999, 57, 705-712.
- JARAMILLO-FLORES M. E., GONZALEZ-CRUZ L., CORNEJO-MAZON M., DORANTES-ALVAREZ, L., GUTIERREZ-LOPEZ, G. F., HERNENDEZ-SANCHEZ, H. Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*). Food Sci.Technol.Int., 2003, 9, 271–278.
- JEANDET P., DOUILLET-BREUIL A-C., BESSIS R., DEBORD S., SBAGHI M., ADRIAN M. Phytoalexins from the vitaceae : biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, anti-fungal activity, and metabolism. J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 2731-2741.
- JIANQIN J., WENCAI Y., ZHEN C., FENGCHANG L., ZHIDA M. Two new phenolic carboxylic acid esters from *Opuntia vulgaris*. J.Chin. Pharmaceut. Sci., 2002, 11, 1–3.
- JOSLYN MA. Tannins and related Phenolics. In Methods in food analysis, 1970, 701-725.
- KATSUBEA T., TSURUNAGAB Y., SUGIYAMAC M., FURUNOD T., YAMASAKI Y. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. Food Chemistry, 2009, 113, 964–969.

- KELEBEK H., CANBAS A., SELLI S. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chemistry*, 2008, 107, 1710–1716.
- KELEBEK H., SELLI S., CANBAS A., CABAROGLU T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 2009, 91, 187–192.
- KLIMCZAKI., MAECKA M., SZLACHTA M., GLISZCZYNSKA-SWIGLO A. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 20, 313–322.
- KONIC-RISTIC A., SAVIKINB K., ZDUNIC G., JANKOVIC T., JURANICC Z., MENKOVIC N., STANKOVIC I. Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food Chemistry*, 2011, 125, 1412–1417.
- KROLL J., RAWEL H. M., ROHN S. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds. *Food Sci. Technol. Res.*, 2003, 9, 205-218.
- KUTI J.O. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chemistry*, 2004, 85, 527–533.
- LAMAISON J.L., CARNAT A. Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus Laevigata* (Poiret D.C) en fonction de la végétation. *Pharm. Acta. Helv.*, 1990, 65 (11), 315-320.
- LAMB B. *Le guide des cactus dans le monde*. Delachaux et Niestlé, 1991, 2-144.
- LEE H.S., CHEN C.S. Rates of vitamin C loss and discoloration in clear orange juice concentrate during storage at temperatures of 4-24°C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46 (11), 4723-4727.
- LEMANSKA K., SZYMUSIAK H., TYRAKOWSKA B., ZIELINSKI R., SOFFER A.E.M.F., RIETJENS I.M.C.M., The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones, *Free Radical Biol. Med.*, 2001, 31, 869-881.
- LEOPOLDINI M., RUSSO N. TOSCANO M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 2011, 125(2), 288-306.

- LORENTE J., VEGARA S., MARTÍ N., IBARZ A., COLL L., HERNÁNDEZ J., VALERO M., SAURA D. Chemical guide parameters for Spanish lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) Juices. *Food Chemistry*, 2014, 162, 186–191
- LOWRY O.H., ROSENBOUGH N.J. FARR A.L. RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951,193, 2665-275.
- LUND D. B. Effects of heat processing on nutrients, in nutritional evaluation of food processing. Harris and E. Karmas, AVI Publishing company INC., Wetsport, Connecticut, 1975, chapter 9.
- MACE TONY, MACE SUZANNE. *Cactées et succulentes*. Hachette livre, 2003, p.12-20.
- MAHYOU H., TYCHON B., BALAGHI R., MIMOUNI J., PAUL R. Désertification des parcours arides au Maroc. *TROPICULTURA*, 2010, 28, 2, 107-114
- MAJDOUB H., ROUDESLI S., DERATINI A. Polysaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia ficus-indica*, extraction, characterization and polyelectrolyte behaviour. *Polymer Int.*, 2001, 50, 552–560.
- MAJDOUB H., ROUDESLI S., PICTON L., LE CERF D., MULLER G., GRISEL M., Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus-indica* physicochemical study in dilute and semidilute solutions. *Carbohydr. Polym.*, 2001, 46, 69–79.
- MALAININE¹ M. E., DUFRESNE A., DUPEYRE D., MAHROUZ M., VUONG R., VIGNON M. R. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*. Cellulose extraction and characterisation. *Carbohydr. Polym.* 2003, 51, 77–83.
- MALAININE² M. E., DUFRESNE A., DUPEYRE, VIGNON M. R, MAHROUZ M. First evidence for the presence of weddellite crystallites in *Opuntia ficus indica* parenchyma. *Pubmed*, 2003, 58, 11-12.
- MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C., JIMENEZ L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 79(5), 727-747.
- MANCEBO-CAMPOS V., DESAMPARADOS SALVADOR M., FREGAPANE G. Antioxidant capacity of individual and combined virgin olive oil minor compounds evaluated at mild temperature (25 and 40 °C) as compared to accelerated and antiradical assays. *Food Chemistry* , 2014, 150, 374–381.

- MARSH T., CULLEN K. W., BARANOWSKI T. Validation of a fruit, juice, and vegetable availability questionnaire. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, 2003, 35(2), 93-97.
- MAZZOTTA, A. S. Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(3), 315–320.
- MEILGAARD M.C. Flavor chemistry of beer, II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *Technical Quarterly- Master Brewers Associations of the Americas*, 1975, 12, 5-13.
- MILLER N. J., DIPLOCK A. T., RICE-EVANS C., DAVIES, M. J., GOPINATHAN, V., MILNER. A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 1993, 84, 407-412.
- MOLYNEUX P. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 2004, 26 (2), 211-219.
- MOON J.K., SHIBAMOTO T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 1655–1666.
- MOURE A., CRUZ J. M., FRANCO D., MANUEL DOMINGUEZ J., SINEIRO J., DOMINGUEZ H., NUNEZ M. J., CARLOS PARAJO J. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 2001, 72(2), 145-171.
- MUHACIR-GÜZEL N., TÜRKYILMAZ M., YEMIS O., TAGI S., OZKAN M. Changes in hydrolysable and condensed tannins of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juices from sacs and whole fruits during production and their relation with antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 2014, 59, 933-940.
- MULAS M., MULAS G. Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres *atriplex* et *opuntia* dans la lutte contre la désertification. *Short and Medium - Term Priority Environmental Action Programme*, 2004.
- MUN LOKE W., PROUDFOOT J.M., STEWART S., MCKINLEY A.J., NEEDS P.W., KROON P.A., HODGSON J.M., CROFT K.D. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: Lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Biochemical Pharmacology*, 1053-1045 ,75 ,2008

- MUNOZ DE CHAVEZ M., CHAVEZ A., VALLES V., ROLDAN J. A. The nopal: a plant of manifold qualities. *World Rev. Nutr. Dietetics*, 1995, 77, 109–134.
- MURILLO-AMADOR B., TROYO DIGUEZ E., NIETO GARIBAY A., AGUILAR GARCIA M. El nopal: cultivo forrajero sostenible para el noroeste de Mexico. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., La Paz, Mexico 2002.
- NILESH R.K., NITIN B.M., DIPAK S.S., MANISHA M.R., SANJAY R.C. Extraction of pectin from citrus fruit peel and use as natural binder in paracetamol tablet. *Der Pharmacia Lettre*, 2012, 4 (2), 558-564.
- NOBEL P. S., CAVELIER J., ANDRADE J. L. Mucilage in cacti: Its apoplastic capacitance associated solutes, and influence on tissue water relations. *J. Exp. Botany*, 1992, 43, 641–648.
- PACKER L., KRAEMER K., RIMBACH G. "Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 2001, 17(10), 888-895.
- PIMIENTA-BARRIOS E. Prickly pear (*Opuntia* spp.): a valuable fruit crop for the semiarid land of Mexico. *J. Arid Environ.*, 1994, 28, 1–11.
- PRIOR R.L., LAZARUS S.A., CAO G., MUCCITELLI H., HAMMERSTONE J.F. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 1270-1276.
- PRIOR R.L., WU X., SCHAICH K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 4290-4302.
- PRISCILLA D.H., PRINCE S.M. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in wistar rats. *Chemico-Biological Interactions*, 2009, 179, 118-124.
- PULIDO R., BRAVO L., SAURA-CALIXTO F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 3396-3402.
- QIU Y., CHEN Y., PEI Y., MATSUDA H., YOSHIKAWA M. New constituents from the fresh stems of *Opuntia dillenii*. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 2003, 12, 1-5.
- RADUNIC M., SPIKA M.J., GORETA BAN S., GADZE J., DÍAZ-PÉREZ J.C., MACLEAN D. Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. *Food Chemistry*, 2015, 177, 53–60.

- RAMASWAMY H.S., ABBATEMARCO C. Thermal Processing of Fruits. En Processing. Technomic Publishing Co., Inc. EUA, 1996, Vol. 1: Biology.
- RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICE-EVANS C. Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medecine*, 1999, 26, 1231-1237.
- RENAUD S., DE LORGERIL M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet*, 1992, 339, 1523-1526.
- RENAULT-ROGER C., PHILOGENE B.J.R., VINCENT C. Biopesticides d'origine vegetal. Edition Tec & doc, 2002, p.337.
- RETAMAL N. DURAN J. M., FERNANDEZ J. Seasonal variations of chemical composition in prickly pear (*Opuntia ficus-indica*(L.) Miller). *J. Sci.Food Agric.*, 1987, 38, 303–311.
- RETSKY K. L., CHEN K., ZEIND J., FREI B. Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(1-2), 90-98.
- REYNOLDS S.G., ARIAS-JIMENEZ E., MONDRAGO N-JACOBO C., PEREZ-GONZALEZ S. El nopal (*Opuntia* spp.) como forraje, *Estudio FAO Produccion y Proteccion Vegetal*, 2003, 169, 344–345.
- RICE-EVANS C.A., MILLER N.J., PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med.*, 1995, 20, 933-956
- RICHARD A., DIXON L. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell.*, 1995, 7, 1085-1097.
- RODRIGUEZ-FELIX A. Postharvest physiology and technology of cactus pear fruits and cactus leaves. *Acta. Hort.*, 2002, 581,191–199.
- RODRIGUEZ-FELIX A., CANTWELL M. Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos), *Plant. Foods Hum. Nutr.*, 1988, 38, 83-93.
- ROHN S. M., RAWEL H., KROLL J. Antioxidant Activity of Protein-Bound Quercetin. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 4725–4729.

- SALT T. A., TOCKER J. E., ADLER J. H. Dominance of D5-sterols in eight species of the Cactaceae. *Phytochemistry*, 1987, 26, 731–737.
- SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 1998, 76, 270-276.
- SANTOS-BUELGA C., SCALBERT A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci, Food Agric.*, 2000, 80, 1094-1117.
- SARTORI-THIEL A. Activités anti microbienne d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. Doctorat Science et Agronomie, 2003, p. 177.
- SARTOR, V., HENDERSON P. T., SCHUSTER, G. B. Radical cation transport and reaction in RNA/DNA hybrid duplexes: effect of global structure on reactivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 11027-110.
- SCHROETER H., BOYD C., SPENCER J. P. E., WILLIAMS R. J., CADENAS E., RICE-EVANS C. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging*, 2002, 23(5), 861-880.
- SHENG Z.L., LI J.C., LI Y.B. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phillyrin from Forsythia Suspense using response surface methodology. *J. Med. Plants. Res.*, 2012, 6, 1633–1644.
- SHENG, Z.L., WAN P.F., DONG C.L., LI Y.H. Optimization of total flavonoids content extracted from Flos Populi using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 2013, 43, 778–786.
- SHUI G., LEONG L.P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2002, 977, 89–96
- SILVA W.A., BONATTO S.L., HOLANDA A.J., RIBEIRO-DOS-SANTOS A.K., PAIXÃO B.M., GOLDMAN G.H, ABE-SANDES K., RODRIGUEZ-DELFIN L., BARBOSA M., PAÇÓ-LARSON M.L., PETZL-ERLER M.L., VALENTE V., SANTOS S.E.B., ZAGO M.A. Correction: mitochondrial DNA variation in Amerindians. *Am. J. Hum. Genet.*, 2003, 72,1346-1348
- SIMPSON R. Engineering aspects of thermal food processing. Taylors and Francis group, 2009, 3-16.

- SINGELTON V. L., ORTHOFER R., LAMUELA R.M. Analyses of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of folin-Ciocalteu reagent. *Oxidant and Antioxidants, Part A*, 1999, 299, 152-178.
- SINGH S., KULSHRESHTHA, M. Mathematical modelling of juice expression from carrots under uniaxial compression." *Journal of Food Engineering*, 1996, 27(3), 323-336.
- SKORIKOVA Y., LYASHENKO E. P. The effect of thermal processing on polyphenolic substances in apple and pear juice. *Izvest. Vyss. Ucheb. Zaved Pish. Tekhnol.*, 1972, 3, 80-82.
- SOARES D., ANDREAZZA A., SALVADOR M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallat, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric.food. Chem*, 2003, 51, 1077-1080.
- STEVENS J.F., TAYLORS A.W., DEINZER M.L. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A*, 1999, 832, 97-107.
- STINTZING F.C., SCHIEBER A., CARLE R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research and Technology*, 2001, 212, 396-407.
- STINTZING F.C., CARLE R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res*, 2005, 49, 175-194.
- SUTTON B. G., TING I. P., SUTTON R., Carbohydrate metabolism of cactus in a desert environment. *Plant Physiol.*, 1981, 68, 784–787.
- TELES F. F. F., STULL J. W., BROWN W. H., WHITING F. M. Amino and organic acids of the prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*L.). *J. Sci. Food Agric.*, 1984, 35, 421–425.
- TELES F. F. F., WHITING F. M., PRICE R. L., BORGES V. E. L. Protein and amino acids of nopal (*Opuntia ficus-indica* L.). *Rev. Ceres*, 1997, 44, 205–214.
- TIMMERMANS R. A. H., MASTWIJK H. C., KNOL J. J., QUATAERT M. C. J., VERVOORT L., VAN DER PLANCKEN I, HENDRICKX M. E., MATSER A. M. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2011 12, 235–243.

- VALKO M., RHODES C. J., MONCOL J., IZAKOVIC M., MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 160(1), 1-40.
- VAMOS-VIGYAZO L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1981, 15, 49–127.
- VAN DEN BERG R., HAENEN G.R., VAN DEN BERG H., BAST A., Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures, *Food Chem.*, 1996, 66, 511-517.
- VEGARA S., MARTÍ N., LORENTE J., COLL L., STREITENBERGER S., VALERO M., SAURA D. Chemical guide parameters for *Punica granatum* cv. 'Mollar' fruit juices processed at industrial scale. *Food Chemistry*, 2014, 147, 203–208.
- VERBEYST L., OEY I., VAN DER PLANCKEN L., HENDRICKX M., VAN LOEY A. Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. *Food Chemistry*, 2010, 123, 269–274
- VERVOORT L., VAN DER PLANCKEN L., GRAUWETA T., TIMMERMANS R.A.H., MASTWIJK H.C., MATSER A.M., HENDRICKX M.E., VAN LOEY A. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2011, 12, 466 - 477.
- VIROT S. Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l' α - β -cristalline. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1, 2004.
- VIVAS DE GAULEJAC N. Vin et santé. Les bases scientifiques du French Paradox. Editions Féret, 2001, p.198.
- WALDRON K. W., PARR A. J., NG A., RALPH J. Cell wall esterified phenolic dimers: Identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochem. Anal.*, 1996, 7, 305–312.
- WALLALI LOUDYI D. Quelques espèces fruitières d'intérêt secondaire cultivées au Maroc. *CIHEAM-Options Méditerranéennes*, 1995, 48-62.
- WANG J.N., CHEN Y.J., HANO Y., TARO N., TAN R.X. Antioxidant activity of polyphenols from seeds of *Vitis amurensis* in vitro. *Acta Pharm. Sinic.*, 2000, 21, 633-636.

- WILLIAMSON G., MANACH C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81, 243-255.
- WILLIS R. B. et ALLEN P. R. Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate. *The analyst.*, 1998, 123, 435-439.
- WRIGHT J. S., JOHNSON E. R., DILABIO G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 1173-1183.
- WRIGHT T. Antioxidants update. *Nutraceuticals World*, 2004.
- YOSHIDA H., KAJIMOTO G., EMURA S. Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1993, 70(10), 989-995.
- YOSHIOKA H., TSUYUMU S., TAKAYANAGI, K. Radical formation during the processing of green tea. *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, 203-204.
- XU G., LIU D., CHEN J., YE X., MA Y., SHI J. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 2008, 106, 545-551.

RAPPORTS

Rapport FAO. El Nopal (Opuntia spp.) Como Forraje, 2003.

Rapport de la Direction Proventiale d'Agriculture de Marrakech, 2012, p. 4-20.

Rapport du Ministere De L'agriculture Et De La Peche Maritime. Etude du marché national et international des produits issus du cactus (fruits frais, raquettes pour aliments de bétail, huiles) et l'exploration des opportunités offertes pour l'exportation. Midfac, 2010, p. 6-53.

WEBGRAPHIE

NATURE ET SANTE. Le figuier de barbarie et son huile. Nature et Santé, Phytothérapie, 2011, 40-42. Disponible sur : http://pharmacies.ma/mail1/officinal_89_figuier_de_barbarie.pdf.

PUBLICATIONS

ANNEXE 1

Effect Of Season On Proximate Composition Of Cladode Juice Of Two Species Of Cactaceae

A. Boutakiout^{1,2}, D. Elothmani^{1*}, M. Mahrouz³, H. Hanine²

*1. UPSP GRAPPE, Groupe ESA, SFR QUASAV 4207, 55, rue Rabelais BP 30748, F-49007 Angers Cedex 01, France.

2. Laboratory of Biointerface and Bioprocedés, Faculty of Sciences and Techniques, university of Sultan Moulay Slimane, Beni Mellal, Morocco.

3. Laboratory of Research and Innovation, Sustainable Development and Green Chemistry Expertise, University of Cadi Ayyad, Faculty of Sciences Semlalia, Marrakech, Morocco.

Abstract: This study evaluates the effects of harvesting seasons on proximate composition, polyphenols, and antioxidant activity of cladode juice of the two species *Opuntia ficus-indica* (spineless) and *Opuntia megacantha* (spiny) selected in Morocco. Proximate composition showed that cladode juice is rich in ascorbic acid (22.88 ± 0.62 mg /100 mL) and potassium (409.35 mg /100 mL) but poor in sugar (1.45 ± 0.03 g/100 mL). Total phenolics and antiradical activity gives high values ranging from 455.65 ± 7.63 to 542.70 ± 1.35 μ g GAE/mL and from 1.78 ± 0.03 to 4.10 ± 0.02 μ mol TE/mL respectively. The highest analyses values were recorded in summer. Correlation analyses indicated that there were two significant relationships ($p < 0.05$) between analyses and the month of harvest and a second between analyses and cultivars. Results of the present study confirmed that components of cladode juice whose phyto-chemistry and phyto-pharmacology should be investigated further in order to detect possible phyto-therapeutic uses.

Keywords: cladode juice, proximate composition, minerals, polyphenols, antioxidant activity.

1 Introduction

Natural products and health foods have recently received a lot of attention both by health professionals and the common population for improving overall well-being, as well as in the prevention of diseases. They are notable by the fact that they are locally available but universally erratic and much related information is also limited but they have a health-promoting benefit [28]. The *Opuntia* genus also known as prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica*; *Opuntia* spp., Cactaceae) contains around 300 species. It belongs to the Cactaceae or cactus family which contains approximately 130 genera and 1500 species [25]. They are widely distributed on arid and semi-arid regions. The origin of this crop comes from the United States, Mexico, and South America. Its cultivation was spread on other continents [9]. The two species *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia megacantha* (Fig.1) are different on their young edible stems called cladodes replacing leaves in their photosynthetic function and which are spineless and spiny respectively [36]. In Morocco, cladodes are generally used as animal feed. We can also have other products like jam or pickles and candied nopales. Prickly pear has also been planted on steep slopes to control erosion [37].

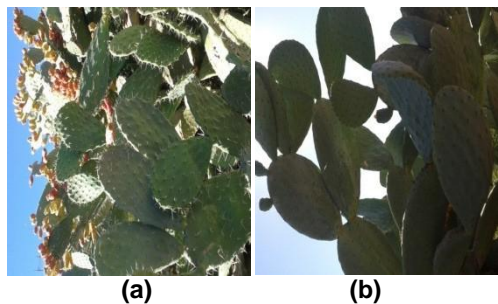


Fig. 1 Cladodes of prickly pear: (a) spineless species; (b) spiny species.

The cactus cladodes are mainly constituted by a heteropolysaccharide with a molecular weight ranging from

104 to 106 g/mol [5]. In addition, the cactus contains chemicals exhibiting potent antioxidant activity and further functional properties [23]; [36]. These bioactive compounds have a considerable health benefit [15]. Extracted compounds from cladodes shows a number of pharmacological actions including antioxidant capacity, antiviral properties, antispermatogenic properties, analgesic, antiulcerogenic, hypoglycemic, antidiabetic, antihyperlipidemic, cholesterol-lowering, and anti-atherogenic effect [36]. They were also valued for their anti-inflammatory activity in treating edema, arthritis, whooping cough, and for preventing wound infection [10]. There are increasing concerns and recommendations for consumers to use natural antioxidants from plant sources since the use of synthetic antioxidants in food (butylated hydroxytoluene BHT, butylated hydroxyanisole BHA) have been restricted because some of them have been found to be toxic and carcinogenic. The frequent consumption of fruits and vegetables rich in natural antioxidants was reported in many epidemiological studies to lower the incidence of certain types of cardiovascular diseases, diabetes and cancer [14]. Moreover, it has been well documented that natural polyphenolic compounds have a close relationship within those properties [27]. Prickly pear contains a wide variety of phenolic compounds which are found to be well correlated with antioxidant potential [36]. Those natural antioxidants can be phenolic compounds (tocopherols, flavonoids, and phenolic acids), nitrogen compounds (alkaloids, chlorophyll derivatives, amino acids, and amines), minerals (selenium and zinc), carotenoids, and vitamins [38]. The nutritional and pharmacological benefits of the different parts of the prickly pear, in addition to its increasing importance at the industrial level, have motivated our investigation about the chemical contents of the cladode juice of the two species *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia megacantha*, this study was carried out to evaluate the proximate composition, antioxidant activity, and total polyphenolic content in order to explore the nutritional properties of cladode juice because there is no study yet on cladode juice of the two species *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia megacantha*.

2 Materials and Methods

2.1 Plant Materials

The materials used for this study are shown in Fig.1. Two different cladodes (spineless and spiny) were collected from the rural town of Ouled Dlim in Marrakech (South of Morocco). The average temperature of this area is between 20 and 22 °C. The warmest month is reaching 48 °C in August and the coldest 3 °C in January. The average rainfall is 199.7 mm/year. Cladodes of the two species *Opuntia ficus-indica* (spiny) and *Opuntia megacantha* (spineless) were collected in three periods during the year, in intermediate, hot, and cold season corresponding to the following months: march (2013), august (2013), and january (2014). Cladode collection was performed in the morning. Cladodes less than a year were selected at random. They were cut to 1 meter height from the ground. The dimensions were chosen according to the following conditions: length between 15 and 25 cm and width between 9 and 12 cm. It is a medium which corresponds to "napolitos" (3-8 months). The quantity harvested was 20 kg for each period. Batches of cladodes were stored at -20 °C before analyses.

2.2 Chemicals and Reagents

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium hydroxide, sodium carbonate, potassium and sodium tartrate, copper II sulfate pentahydrate, tannic Acid, potassium iodate, aluminum chloride, rutin, sulfuric acid, phenol, glucose, iodine, Trolox and methanol were purchased from R&M Chemicals (Essex, UK). The DPPH (2,2-diphenyl-1-picridazil) was purchased from the Fluka company (Switzerland).

2.3 Extract Preparation

Extraction of juice was made by grinding and centrifuging cladodes. The spines were removed and cladodes were cut into cubes of 2 cm. They were crushed at 10000 rpm for 20s, and then centrifuged at 15000 rpm at 4 °C for 20 min. The supernatant was recovered and the clarified juice obtained was stored at -20 °C prior to analyses. The juice yield was calculated relative to the initial mass of cladodes.

2.4 Proximate analysis

Moisture was determined from sample weight loss after oven drying the juice at 110 °C for 4 h. Ash was calculated after heating the sample at 550 °C for 3 h. Titrable acidity was measured by titration of 25 mL of juice in the presence of sodium hydroxide (0.25 N) to a pH of 8.1. The pH was measured using a pH meter (S20 SevenEasy, Mettler Toledo). The degrees Brix was measured using an electronic refractometer (KYOTO, RA-130).

2.4.1 Proteins

The total protein content was performed by the method of Lowry et al.(1951) with some modifications [24]. The juice was diluted with distilled water to 1/20. An alkaline pretreatment solution was prepared by weighing 20g of sodium hydroxide, 100g of sodium carbonate, 2g of potassium and sodium tartrate, and 0.5g of copper II sulfate pentahydrate then completing by distilled water to 1000 mL. The working solution was made by mixing 1 mL of the diluted juice with 1 mL of the pretreatment solution and it was allowed to stand for 10 min at room temperature. Then

4 mL of Folin reagent diluted to 1/8 was added. The solution was incubated for 5 min at 55 ± 1 °C and cooled in cold water for 30 min. The measurement of the absorbance was at 670 nm using a spectrophotometer (Power wave XS BIOTECK). The change in absorbance between the final reading selected and the blank reading was calculated for each sample. The concentration of Bovine Serum Albumin (BSA) used as a standard was between 1 and 20 mg/100mL. Results were expressed in mg BSA Equivalent/mL. The experiment was repeated three times.

2.4.2 Condensed Tannins

This assay was performed according to the colorimetric method of Folin Denis by Joslyn (1970) with some modifications [17]. The juice was diluted with a water-methanol mixture (2:3) to 1/10. The working solution was made by mixing 0.5 mL of the diluted juice with 2.5 mL of Folin and 5 mL of sodium carbonate (7.5%). The mixture was allowed to stand for 30 min at room temperature in the dark. Then the solution was incubated for 5 min at 55 ± 1 °C and cooled in cold water for 30 min. The measurement of the absorbance was at 760 nm using a spectrophotometer (Power wave XS BIOTECK). The change in absorbance between the final reading selected and the blank reading was calculated for each sample. The concentration of tannic acid used as standard was between 10 and 100 mg/L. Results were expressed in mg Tannic Acid Equivalent/mL. The experiment was repeated three times.

2.4.3 Water Soluble Tannins

Water soluble tannins are determined by the method of Willis and Allen (1998) with some modifications [39]. The juice was diluted with a water-methanol mixture (2:3) to 1/10. The working solution was made by mixing 0.5 mL of the diluted juice with 2.5 mL of potassium iodate solution (2.5%) and it was allowed to stand for 4 min at room temperature in the dark. The measurement of the absorbance was at 550 nm using a spectrophotometer (Power wave XS BIOTECK). The change in absorbance between the final reading selected and the blank reading was calculated for each sample. The concentration of tannic acid used as standard was between 10 and 100mg/L. Results were expressed in mg Tannic Acid Equivalent/mL. The experiment was repeated three times.

2.4.4 Flavonoids

Total flavonoids content was determined using the method of Lamaison and Carnat (1990) with some modifications [21]. The juice was diluted with a water-methanol mixture (2:3) to 1/100. The working solution was made by mixing 1 mL of diluted juice with 1 mL of aluminum chloride (2%). The measurement of the absorbance was at 430 nm using a spectrophotometer (Power wave XS BIOTECK). The change in absorbance between the final reading selected and the blank reading was calculated for each sample. The concentration of rutin used as the standard was between 10 and 100 mg/L. Results are expressed in mg Equivalent Rutin/mL. The experiment was repeated three times.

2.4.5 Sugars

The determination of sugars was realized by the method of Dubois (1965) with some modifications [12]. The working solution was made by mixing 1 mL of juice with 1 mL of

phenol (10 %) and 5 mL of concentrated sulfuric acid. The measurement of the absorbance was immediate at 430 nm using a spectrophotometer (Power wave XS BIOTECK). The change in absorbance between the final reading selected and the blank reading was calculated for each sample. The concentration of glucose used as standard was between 10 and 100mg/L. Results are expressed in mg Equivalent Glucose/mL. The experiment was repeated three times.

2.4.6 Pectin

The determination of pectin was made by mixing 2 mL of juice with 6 mL of ethanol (80%) in an acidic medium (pH = 1.5). Then the mixture was centrifuged at 8000 rpm for 15 min, and then the pellet was recovered in an oven set at 50 °C. The percentage of pectin in the juice was calculated by mass difference.

2.4.7 Ascorbic Acid

The determination of ascorbic acid was realized according to the iodometric method. The working solution was made by mixing 5 mL of the juice with 5 mL of iodine (0.005 M) and some drops of starch paste. Titration was carried out with the addition of thiosulfate (0.005 M) until disappearance of the dark color.

2.4.8 Minerals

Minerals quantified in this analysis are the macro-elements: Ca, K, Mg, Na. Analysis was performed by ICP Atomic Emission Spectrometry (AES Ultima 2-Jobin Yvon).

2.5 Determination of the Free DPPH Radical Scavenging Effect

The DPPH assay was done according to the method of Brand-Williams et al. (1994) prepared with some modifications [7]. Samples were analyzed in methanol extract by mixing 2g of juice with 22 mL of methanol and homogenized. The stock solution of DPPH• was prepared in methanol with a concentration of 60 µM. The solution was stirred for 30 min protected from light. The working solution was obtained by mixing 0.1 mL of cladode extract with 3.9 mL of the DPPH solution. The samples were allowed to react for 8h in the dark and the decrease in absorbance at 515 nm was measured using a spectrophotometer (Power wave XS BIOTECK). The blank contains 0.1 mL of methanol instead of extracts. The experiment was carried out in triplicate. Results are expressed in µmol Trolox Equivalent (TE)/mL. The concentration of Trolox as standard was between 10 and 500 µM in methanol. DPPH• radical scavenging capacity was calculated using following equation.

$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ scavenging effects \%} = \frac{A_{(\text{blank})} - A_{(\text{sample})}}{A_{(\text{blank})}} \times 100$$

Where A_{blank} is the absorbance of the blank and A_{sample} is the absorbance of the sample.

2.6 Total Phenolics Content

Total phenolics were determined by Folin-Ciocalteu method of Singleton et al. (1999) with some modifications [34]. Samples were analyzed in methanol extract by mixing 2g of juice with 22 mL of methanol and homogenized. The stock

solution included 1:10 of Folin-Ciocalteu reagent, 60g/L of sodium carbonate. The homogenates were then centrifuged at 15 000 rpm for 20 min. The supernatants were recovered and stored at -20 °C until analyses. The working solution was prepared by mixing 1.5 mL of diluted Folin-Ciocalteu reagent with 0.2 mL of cladode extract. Then let the mixture stand for 5 min and add 1.5 mL of sodium carbonate. The absorbance was measured at 725 nm after 30 min of reaction. The change in absorbance between the final reading selected and the blank reading was calculated for each sample. Results are expressed in µg Gallic acid Equivalent/mL. The concentration of Gallic acid as standard was between 10 and 500 µM in methanol. The experiment was carried out in triplicate.

2.7 Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted to compare the results obtained in the replications and the data were expressed as the mean ± standard deviation (SD). All the analysis was performed by Statistical Analysis System (SAS) software 917 SAS Institute Cay N.C. (USA). Using analysis of variance (ANOVA) and differences among means were determined for significance at $p < 0.05$ using the PROC GLM procedure.

3 Results and Discussion

3.1 Yield and Proximate Composition of the Juice

The juice yield of the two species *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia megacantha* obtained from their cladodes showed that both varieties are rich in water (Table 1).

Table 1 Juice yield of the two species *Opuntia ficus-indica* (spineless) and *Opuntia megacantha* (spiny).

Months	Juice yield (%)	
	Spineless	Spiny
March	51.96±0.00 ^a	63.39±0.00 ^a
August	20.83±0.00 ^c	35.58±0.00 ^c
January	38.25±0.00 ^b	45.19±0.00 ^b

^{a,b,c,d} Values having same letter within the column did not differ significantly from each other according to LSD test at $p < 0.05$.

The yield values varied largely among the two species, where cladodes obtained in march achieved the highest yield and precisely with the spiny form (63.39 %), cladodes obtained in august had the lowest yield and it was observed with the spineless form (20.83%). We note that the spiny form registered the highest values of juice yield during the three seasons. In a study of citrus, mandarin juice yield ranged from 42.85 % to 60.74 %, orange from 43.53 % to 50.79 %, lemon 40.39 %, and grapefruit 40.04% [40]. Indeed, we can compare cladode juice yield with citrus juices yield except in summer where we observe a very low yield of cladode juice (20.83% –35.58%). We have to know that rain is the only source of water for these plants so it influences their ability to store water. In those cultivars, 3 months of drought decreases photosynthesis night phase (down of 73% of nocturnal acid accumulation in the chlorenchyma) and abolishes sweating, but also 27% of the water in the chlorenchyma and 61% of water in

parenchyma are lost during this period [16]. It was reported that spine functions include mechanical protection from herbivores, reflection of light, reducing the surface area of the cortex in the sun exposure, raising water retention and condensing fog [22]; [36]. In fact, the juice yield was higher

for the spiny cladodes than the spineless. Proximate compositions of cladode juice are shown in Table 2, 3 and 4. Table 2 summarized general composition of spiny and spineless cladodes species.

Table 2 Relevant chemical characteristics of cladode juice of the two species *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia megacantha*

Months	Species	Water (g/100g of juice)	Ash (g/100g of juice)	Degrees Brix (°Bx)	pH	Titrateable acidityEquivalent citric acid (g/L)
March	Spineless	95.68 ± 0.07 ^a	0.82 ± 0.03 ^c	5.5±0.0 ^c	4.68±0.01 ^a	1.45±0.01 ^c
	Spiny	95.62 ± 0.01 ^a	0.75 ± 0.01 ^d	5.1±0.0 ^c	4.74±0.01 ^a	1.03±0.01 ^d
August	Spineless	91.00 ± 0.26 ^c	1.74 ± 0.04 ^a	11.0±0.0 ^a	4.77±0.01 ^a	1.88±0.01 ^b
	Spiny	91.26 ± 0.04 ^c	1.67 ± 0.00 ^a	10.7±0.0 ^a	4.74±0.01 ^a	2.35±0.01 ^a
January	Spineless	95.13 ± 0.11 ^a	0.79 ± 0.02 ^d	6.1±0.0 ^b	4.57±0.01 ^a	1.20±0.01 ^d
	Spiny	94.24 ± 0.11 ^b	0.96 ± 0.02 ^b	7.2±0.0 ^b	4.49±0.01 ^a	1.52±0.01 ^c

^{a,b,c,d} Values having same letter within the column did not differ significantly from each other according to LSD test at $p < 0.05$.

High moisture, ash, and TSS (Brix) contents were observed for both varieties of cladodes, but more important for the spineless species. However, the two varieties of cladodes exhibit a higher acidity value, and low pH value. This low acidity value and low pH value could be explained by the presence of many organic acids as malic, citric and oxalic acids as salts form [36]. These results were in concordance with previously works of [32], a pH value of 4.6 was registered for cladodes of *O. ficus indica* f. *amylocea* and *O. ficus indica* f. *inermis* cultivated in Mexico. Indeed, the composition of cladodes varieties depending on the edaphic factors at the cultivation site, the season and the age of the plant [30]. Therefore, the respective values vary both among species and varieties and should not be taken as absolute values [32]. Water content ranged from 95.68 ± 0.07 to 91.00 ± 0.26 g/100g. Spiny cladodes have recorded the lowest values of water content during the three seasons

and precisely in august (91.00 ± 0.26 g/100g). In general, for cactus stems of *Opuntia* the water content is between 88 – 95% [36]. Ash ranged from 1.74 ± 0.04 to 0.75 ± 0.01 g/100g. The highest values of ash were observed for the spiny form and more in august. We can observe that those two responses (water content and ash) are inversely proportional which can explain that spiny cladodes are rich in bimolecular compounds. We had the same results for the °Brix, pH and titrable acidity, spiny cladodes and cladodes collected in august had the highest values. The pH was between 4.49 – 4.77, therefore the juice has a medium acidity. In addition, these results demonstrate the good nutritional potential of this Cactaceae species and establish the basis for further studies to test the possibilities of the use the species as an alternative feed resource for human and animals.

Table 3 Proximate composition of cladode juice of the two species *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia megacantha*

Month	Species	Proteins (g /100mL)	Sugars (g/100mL)	Pectins (%)	Condensed tannins (mg/100mL)	Hydrosoluble tannins (mg/100mL)	Flavonoids (mg/100mL)	Ascorbic acid (mg/100 mL)
March	Spineless	0.18 ± 0.02 ^d	0.76 ± 0.01 ^b	0.10 ^f	12,10 ± 0,21 ^f	1,28 ± 0,04 ^a	1,24 ± 0,01 ^b	22,88 ± 0,62 ^a
	Spiny	0.27 ± 0.01 ^c	0.66 ± 0.01 ^b	0.30 ^e	13,34 ± 0,36 ^e	1,36 ± 0,15 ^a	1,22 ± 0,00 ^{b,c}	19,36 ± 3,11 ^b
August	Spineless	0.50 ± 0.04 ^a	1.45 ± 0.03 ^a	2.25 ^a	16,90 ± 0,43 ^b	1,32 ± 0,05 ^a	1,36 ± 0,04 ^a	17,60 ± 0,62 ^c
	Spiny	0.48 ± 0.02 ^a	1.30 ± 0.03 ^a	1.85 ^b	18,23 ± 0,36 ^a	1,33 ± 0,15 ^a	1,35 ± 0,05 ^a	19,36 ± 1,87 ^b
January	Spineless	0.34 ± 0.03 ^b	0.85 ± 0.02 ^b	0.45 ^d	14,96 ± 0,13 ^c	1,24 ± 0,02 ^a	1,21 ± 0,02 ^{b,c}	17,60 ± 1,87 ^c
	Spiny	0.40 ± 0.04 ^b	0.86 ± 0.02 ^b	0.95 ^c	14,07 ± 0,14 ^d	1,30 ± 0,13 ^a	1,18 ± 0,01 ^c	22,00 ± 0,65 ^a

^{a,b,c,d,e,f} Values having same letter within the column did not differ significantly from each other according to LSD test at $p < 0.05$.

Results showed that cladodes harvested in august has the highest values for most of analyses (Table 3). Crude protein content ranged from 0.18 ± 0.02 to 0.50 ± 0.04 g /100 mL. It was reported that on a fresh weight basis of spineless

Opuntia cladode, protein content was between 0.1 and 1 g /100g and the major amino acid detected was glutamine, followed by leucine, lysine, valine, arginine, phenylalanine and isoleucine [36]. Total sugar content ranged from 1.45 ±

0.03 to 0.66 ± 0.01 g/100 mL. It was reported that for fresh cladode weight it reaches 0.32 g/100g [36]. Total sugar content of Moro and Sanguinello orange juice reached 10.3 and 10.9 g/100mL respectively [18], apple 9.95 g/100 mL, grape 16.1 g/100 mL, pineapple 11.6 g/100 mL, and tomato 3.86 g/ 100 mL [8]. We notice that cladode juice is poor in sugar compared to other juices. It makes cladodes a low-calorie food with 27 kcal/100g [36]. Pectin values content reached 2.25 %, these pectin, partially responsible for the viscosity of the juice of cladode. We can compare it with apple juice where the values range from 2.62 to 2.94 % [2]. Condensed tannins are more present in cladode juice ($18, 23 \pm 0, 36$ mg/100 mL) than hydrosoluble tannins (1.36 ± 0.15 mg/100 mL). The same thing was noticed in

pomegranate juice for condensed and hydrosoluble tannins (43.20 ± 0.70 and 10.80 ± 0.30 respectively) [26]. Total flavonoids ranged from 1.36 ± 0.04 to 1.18 ± 0.01 mg/100 mL. In grape juice higher values were reported (7.24 mg/100mL) [11]. Ascorbic acid ranged from 17.60 ± 1.87 to 22.88 ± 0.62 mg/100mL. It was reported that the average of ascorbic acid in Opuntia cladodes was between 7 and 22 mg/100 mL [36]. In other juices higher and lower values were reported: orange (38.30 mg/100 mL), apple (11 mg/100 mL), grape (Traces), pineapple (9.5 mg/100 mL), and tomato (16.6 mg/100 mL) [10]. We can conclude that juice cladode contains a great amount of ascorbic acid compared to other juices.

Table 4 Mineral content of cladode juice of the two species Opuntia ficus-indica and Opuntia megacantha

Month	Species	Ca (mg/100 mL)	K (mg/100 mL)	Mg (mg/100 mL)	Na (mg/100mL)
March	Spineless	21.43 ^d	51.88 ^e	4.52 ^f	0.02 ^f
	Spiny	258.78 ^a	156.02 ^c	91.31 ^a	0.46 ^b
August	Spineless	2.67 ^f	44.23 ^f	9.20 ^e	0.04 ^e
	Spiny	4.59 ^e	409.35 ^a	86.23 ^b	1.87 ^a
January	Spineless	29.71 ^c	155.57 ^d	44.80 ^d	0.17 ^d
	Spiny	45.37 ^b	162.88 ^b	51.33 ^c	0.20 ^c

^{a,b,c,d,e,f} Values having same letter within the column did not differ significantly from each other according to LSD test at $p < 0.05$.

Results showed that mineral content in juice cladode varies between seasons and species (Table 4). Potassium is the main mineral amounting to about 409.35 mg/100 mL of juice present in spiny cladodes harvested in August. This value is higher than the average amount of potassium in Opuntia cladodes (166 mg/ 100g) [36]. It was reported that the amount of potassium in apple juice was 106.80 mg/100mg (ABID et al., 2014), black currant juice 208.73 mg/100 mg, bilberry juice 92.96 mg/100 mg, and black raspberry juice 177.93 ± 8.21 mg/100g [19]. We observe that calcium and magnesium have approximately the same amount in juice cladode. But, the poor component was registered for sodium (0.025 mg / 100mL). The average content of calcium in Opuntia cladode is 93 mg/100mg while magnesium was not detected [36]. In apple juice it was registered 2.95 mg / 100g of calcium, 18.55 mg / 100g of magnesium, and 34.40 of sodium [1]. It was reported that in pulp, potassium is present at 161 mg/100 g, exceeding the concentration of other minerals like calcium and magnesium [13]. In fact, comparison between cladode juice and other juices showed that cladode juice is rich in potassium had a medium amount in Ca and Mg but poor in Na. These results demonstrate the good nutritional potential of this Cactaceae species and establish the basis for further studies to test the possibilities of the use the species as an alternative feed resource for human and animals.

3.2 Antioxidant Activity and Polyphenols Content

Antioxidant activity and polyphenols content was measured from a single extract three times to test the reproducibility of the assay (Table 5).

Table 5 Antioxidant activity and polyphenols content of juice cladodes of the two species: Opuntia ficus-indica and Opuntia megacantha.

Months	Species	DPPH (μ mol TE/mL)	Polyphenols (μ g GAE/mL)
March	Spineless	1.78 \pm 0.03 ^d	455.65 \pm 7.63 ^b
	Spiny	1.78 \pm 0.03 ^d	464.90 \pm 7.42 ^b
August	Spineless	3.58 \pm 0.03 ^{ab}	542.70 \pm 1.35 ^a
	Spiny	4.10 \pm 0.02 ^a	542.57 \pm 1.47 ^a
January	Spineless	2.70 \pm 0.04 ^c	523.90 \pm 1.85 ^a
	Spiny	3.14 \pm 0.06 ^{bc}	524.19 \pm 2.79 ^a

^{a,b,c} Means within a column for each type of assay that have different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Polyphenols content ranged from 455.65 ± 7.63 to 542.70 ± 1.35 μ g GAE/mL. The Highest value was registered in August (542.70 ± 1.35 μ g GAE/mL). Cladode Juice collected in January did not present a significant difference (524.19 ± 2.79 GAE/mL) but in March a significant variation was noticed (464.90 ± 7.42 μ g GA/mL). It was reported that total phenolics content for other juice fruits are: apple (296.3 ± 6.4 μ g GAE/mL), banana (90.4 ± 3.2 μ g GAE/mL), blackberry (26.7–452.7 μ g GAE/mL), blueberry (261–587 μ g GAE/mL), mango (6.25 ± 0.05 μ g GAE/mL), pineapple (94.3 ± 1.5 μ g GAE/mL), and strawberry (160 ± 1.2 μ g GAE/mL) [4]. Indeed, cladode juice is rich in polyphenols compared to other fruit juices. Antioxidant activity of juice cladodes in methanol extract was slow and take more time compared to other juices or extracts. Determination of the end of the reaction is the most important step. The semi plate that appears over time informs us that the reaction is finished [7]. Determining IC50 which is widely used for the

DPPH assay to express the antioxidant activity could not be realized because the reaction is very slow and does not reach 50% of radical scavenging of DPPH•. Antioxidant activity of phenolic acids and their esters depends on the number of hydroxyl groups in the molecule that would be strengthened by steric hindrance [31]. The chemical properties of polyphenols in terms of the availability of the phenolic hydrogens as hydrogen donating radical scavengers predict their antioxidant activity [29]. Plant phenolic compounds react with proteins and enzymes under formation of covalent bonds [20]. These reactions diminish the antioxidant activity of phenolic compounds. Nevertheless, a covalent attachment to proteins means generally a loss of antioxidant activity of polyphenols like quercetin [33]. Such interactions between proteins and phenols can also take place *in vivo*. In this respect it was reported that the plasma proteins can mask the antioxidant activity (TEAC assay) of phenolic compounds (quercetin, rutin, catechin, and 7-mono-hydroxyethylrutin) [3]. Analyses of antioxidant activity in cladode juice take time to react knowing they are rich in polyphenols. Extraction compounds and analyzing their antioxidant activities and their interactions as polyphenols, sugars, proteins and vitamins will help us better define this relationship. Antiradical activity of cladode juice was between $1.78 \pm 0.03 - 4.10 \pm 0.02 \mu\text{mol TE/mL}$ by DPPH assay. It was reported that antioxidant activity of lemon juice by DPPH assay reached $0.26 \pm 0.09 \mu\text{mol TE/mL}$, it is far lower compared to juice cladode [6]. Thus, even if we had a slow reaction which can be due to steric inaccessibility or proteins involving polyphenols, the richness of the juice in antioxidant gives us great values.

4 CONCLUSION

From the presented data, cladode juice has been subject to several analyses due to its great compositional diversity. Proximate composition showed that cladode juice is rich in potassium and ascorbic acid but poor in sugars which make cladodes a low-calorie food. Cladode juice extracted in August gave the highest values for most analyses (proximate composition, polyphenols content, and other compounds). Warm periods minimize water retention so cladodes have a high concentration of bimolecular compounds. It was also noticed that spiny cladodes has a higher antioxidant activity and polyphenol content than the spineless species. The present work showed that the juice cladodes serve as a good source of natural antioxidant compounds suitable for application in the pharmaceutical field and could potentially be considered as a functional food or functional food ingredient. Nowadays, this hidden knowledge needs to be discovered and re-evaluated. Sophisticated analytical approaches and innovative processing technologies will open new avenues to further promote the use of cactus pear stems, fruits and flowers in food, medicine, cosmetic, and pharmaceutical industries. An increasing demand would help encourage farmers to increase their acreage and thus also help to counterbalance erosion.

References

- [1] M. Abid, S. Jabbar, T. Wu, M. Muhammad Hashim, B. Hu, S. Lei, and X. Zeng, "Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice," *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, pp. 93-97, 2014.
- [2] S. Akhtar, F. Khan, and B. Javid, "Nutritional Composition, Sensory Evaluation and Quality Assessment of Different Brands of Commercial Tetra Pack Apple Juices Available in Local Market of Peshawar Pakistan", *Global Journal of Biotech. and Biochem.*, 8, pp. 69-73, 2013.
- [3] M. J. T. J. Arts, G. R. M. M. Haenen, L. C. Wilms, S. A. J. N. Beetstra, C. G. M. Heijnen, H. P. Voss, and A. Bast, "Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity", *J. Agric. Food Chem.*, 50, pp. 1184-1187, 2001.
- [4] N. Balasundram, K. Sundram, and Samman S, "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses", *Food Chemistry*, 99, pp. 191-203, 2006.
- [5] N. Barka, K. Ouzouit, M. Abdennouri, and M. El Makhfouk, "Dried prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes as a low-cost and eco-friendly biosorbent for dyes removal from aqueous solutions", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44, pp. 52-60, 2013.
- [6] D. Barreca, E. Bellocco, C. Caristi, U. Leuzzi, and G. Gattuso, "Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice", *Food Chemistry*, 129, pp. 417-422, 2011.
- [7] W. Brand-Williams, E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity", *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, pp. 25-30, 1994.
- [8] V. Braescoa, T. Gauthier, and F. Bellisle, "Fruit juices and fruit nectars", *Cahiers de nutrition et de diététique*, 48, pp. 248-256, 2013.
- [9] N. Chougui, H. Louaileche, S. Mohedeb, Y. Mouloudj, Y. Hammaoui, and A. Tamendjari, "Physico-chemical characterization and antioxidant activity of some *Opuntia ficus-indica* varieties grown in North Algeria", *Afr. J. Biotechnol.*, 12, pp. 299-307, 2013.
- [10] M.S. Defelice, "Prickly pear Cactus, *Opuntia* spp., A Spine-Tingling Tale", *Weed. Technol.*, 18, pp. 869-877, 2004.
- [11] M. Dos Santos Lima, I. De Souza Veras Silani, Maia Toaldo, L. Claudio Corrêa, L. Camarão Telles Biasoto, G. Elias Pereira, and M.T. Bordignon-Luiz, "Phenolic compounds, organic acids and

- antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil", *Food Chem.*, 161, pp. 94-103, 2014.
- [12] M. Dubois, K. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.*, 28, pp. 350-356, 1965.
- [13] K. El-Mostafa, Y. El Kharrassi, A. Badreddine, P. Andreoletti, J. Vamecq, M.S. El Kebbj, N. Latruffe, G. Lizard, B. Nasser B. and M. Cherkaoui-Malki, "Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition", *Health and Disease. Molecules*, 19, pp. 14879-14901, 2014.
- [14] A.H. El-Sayed, M.A. Nagaty, M.S. Salman, and S.A. Bazaid, "Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif", *Food. Chem.*, 160, pp. 31-38, 2014.
- [15] G. Giovanna, M.L. Parker, R.N. Bennett, J. Robertson, G. Mandalari, A. Narbard, R.B. Lo Curto, G. Bisignano, C.B. Faulds, and K.W. Waldron, K.W, "Anatomical, chemical, and biochemical Characterization of cladodes from Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.)" *J. Agric. Food. Chem.*, 57, pp. 10323-10330, 2009.
- [16] G. Goldstein, L. Andrade, and P. Nobel, "Differences in Water Relations Parameters from the Chlorenchyma and the Parenchyma of the *Opuntia ficus-indica* under Wet versus Dry Conditions" *Aust. J. Plant. Physiol*, 18, pp. 95-107, 1991.
- [17] J.M.A. Joslyn, "Tannins and related Phenolics". In *Methods in food analysis*, p. 701-725, 1970.
- [18] H. Kelebek, A. Canbas, and S. Selli, "Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey", *Food Chemistry*, 107: 1710-1716, 2008.
- [19] A. Konic-Ristic, K. Savikinb, G. Zdunic, T. Jankovic, Z. Juranic, N. Menkovic, and I. Stankovic, , "Biological activity and chemical composition of different berry juices", *Food Chemistry*, 125, pp. 1412-1417, 2011.
- [20] J. Kroll, H. M. Rawel, and S. Rohn, "Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds", *Food Sci. Technol. Res.*, 9, pp. 205-218, 2003.
- [21] J.L. Lamaison, and A. Carnat, A., "Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegeus monogyna* Jacq et de *Crataegeus Laevigita* (Poiret D.C) en fonction de la vegetation", *Pharm. Acta helv.*, 65, pp. 315-320, 1990.
- [22] H.N. Le Houérou, "Cacti (*Opuntia* spp.) as a fodder crop for marginal lands in the Mediterranean basin. Proc. 4th IC on Cactus pear and cochineal", *Acta Hort.*, 581, pp. 21-46, 2002.
- [23] M.A. Livrea, and L. Tesoriere, L., "Health benefits and bioactive components of the fruits from *Opuntia ficus -indica* [L.] Mill", *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 8, pp. 73-90, 2006.
- [24] O.H. Lowry, and N.J. Rosenbrough., "Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, 193, pp. 2665-275, 1951.
- [25] Y. Mohamed-Yasseen, S.A. Barringer, and W.E. Splittstoesser, "A note on the uses of *Opuntia* spp. In Central/North America", *J. Agric. Environ.*, 32, pp. 347-353, 1996.
- [26] N. Muhacir-Güzel, M. Türkyilmaz, O. Yemis, S. Tagi, and M. Ozkan, "Changes in hydrolysable and condensed tannins of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juices from sacs and whole fruits during production and their relation with antioxidant activity", *Food Science and Technology*, 59, pp. 933-940, 2014.
- [27] M. Pinent, A. Castell, I. Baiges, G. Montagut, L. Arola, and A. Ardévol, "Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells", *Compr. Rev. Food. Sci.*, 7, pp. 299-308, 2008.
- [28] K.W. Prasad, Kong, K.W., N.S. Ramannan, A. Azrina, and I. Amin, "Selection of experimental domain using two level factorial design to determine extract yield, antioxidant capacity, phenolics and flavonoids from *Mangifera pajang* Kosterm", *Sep. Sci. Techno.*, 47, pp. 2417-2423, 2012.
- [29] S.O. Renaud, and M. De Lorgeril, "Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease", *Lancet*, 339, pp. 1523-1526, 1992
- [30] N. Retamal, J.M. Duran, and J. Fernandez, "Seasonal variations of chemical composition in prickly pear (*Opuntia ficus- indica*(L.)Miller)", *J. Sci. Food. Agric.*, 38, pp. 303-311, 1987.
- [31] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, and G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids", *Free Radical Bio. Med.*, 20, pp. 933-956, 1995.
- [32] A. Rodriguez-Felix, and M. Cantwell, "Development and changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos)", *Plant. Foods. Hum. Nutr.*, 38, pp. 83-93, 1988.

- [33] S.M. Rohn, H. Rawel, H., J. Kroll, "Antioxidant Activity of Protein-Bound Quercetin". *J. Agric. Food Chem.*, 52, pp. 4725-4729, 2004.
- [34] V.L. Singleton, R. Orthofer, and R.M. Lamuela., "Analyses of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of folin-Ciocalteu reagent. Oxidant and Antioxidants Part A", 299, pp. 152-178, 1999.
- [35] F.C. Stintzing, K.M. Herbach, M.R. Mosshammer, R. Carle, W. Yi, and S. Sellappan, "Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 442-451, 2005.
- [36] F.C. Stintzing, and R. Carle, "Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses", *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, pp. 175-194, 2005.
- [37] H.A. Synman, "A greenhouse study on root dynamics of cactus pears, *Opuntia ficus-indica* and *O. robusta*", *J. Arid. Environ.*, 65, pp. 529-542, 2006.
- [38] Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, and B.D. Oomah, "Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products", *J. Agric. Food. Chem.*, 46, pp. 4113-4117, 1998.
- [39] R.B. Willis, and P.R.N. Allen, 1998, "Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate", *The analyst.*, 123, 435-439.
- [40] G. Xu, D. Liu, J. Chen, X. Ye, Y. Ma, and J. Shi, "Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*", 106, pp. 545-551, 2008.

ANNEXE 2

Phytochemical Constituents And In Vitro Radical Scavenging Activity Of Different Cladodes Juice Of Cactacea Cultivars From Different Areas In Morocco

A. Boutakiout^{1,2}, D. Elothmani^{1*}, M. Mahrouz³, H. Hanine²

*1. UPSP GRAPPE, Groupe ESA, SFR QUASAV 4207, 55, rue Rabelais BP 30748, F-49007 Angers Cedex 01, France.

2. Laboratory of Biointerface and Bioprocesed, Faculty of Sciences and Techniques, university of Sultan Moulay Slimane, Beni Mellal, Morocco.

3. Laboratory of Research and Innovation, Sustainable Developpement and Green Chemistry Expertise, University of Cadi Ayyad, Faculty of Sciences Semlalia, Marrakech, Morocco.

ABSTRACT: The antioxidant activities of prickly pear cladode juice were studied by DPPH, TEAC and FRAP methods. The chemical composition of the samples was determined by liquid chromatography. The antioxidant properties of different cladode juice for different regions were studied. The region of EL Kelaa registered the highest values in antioxidant activities and total polyphenols: 13.19 mmol Fe²⁺/L, 70.21 mg Trolox/L, 4654.83 mg Trolox/L were done by FRAP, DPPH and TEAC assays respectively and 477, 95 mg Gallic acid / L in polyphenols content. Spiny cladodes had higher values for most analyses compared to spineless cladodes. A correlation between polyphenols, flavonoids and antioxidant activity was observed, which indicates the implication of those components in antioxidant power. Results of the present study confirmed that bimolecular compounds of cladode juice can be used in pharmaceutical and cosmetic applications.

Keywords: Cladode, Prickly, cactacee, dietary fiber, Antioxidant activity, polyphenols, flavonoids, DPPH, FRAP, TEAC.

1. INTRODUCTION

The prickly pear cactus is an endemic plant of America. There are more than 258 known species and 114 of them can be found in Mexico. In Morocco, several species from *Opuntia* genera have been found. These succulent perennial plants like trees reach 3–5 m with a woody trunk and stems 30–60 cm long or more. The stems are formed by groups of opaque-green cladodes, with areolas that contain numerous thorns; they produce large yellow flowers, followed by sweet yellow or reddish-purple fruits. The two best-known species of this Moroccan cactus is *Opuntia ficus-indica* (spineless) and *Opuntia megacantha* (spiny). For centuries, cladodes have been a nutritional source in Mexico. Mexican diet includes cladodes cooked as vegetables and combines them in a variety of salads, soups, stews, and other meals [1]. The cactus pear fruit of *Opuntia ficus-indica* is associated with the semi-arid zones of the world; it is one of the few crops that can be cultivated in areas which offer a very little growth possibility for common fruits and vegetables [2]. The prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica*; *Opuntia* spp., Cactaceae) is native to the United States, Mexico and South America, but it grows well in other areas, including Africa, Australia and the Mediterranean region [3]. Recently, in some countries such as Mexico, Italy and South Africa, the prickly pear is grown on large surfaces for industrial purposes. In Mexico, his culture extends over an area of 300,000 ha, while in Morocco, the area of Prickly Pear cultivation is about 120,000 ha [4,5]. With the exception of the Sahara and mountainous regions, the prickly pear is widely present in the Moroccan countryside, but its cultivation is poorly organized and structured. In Morocco, the cultivation of prickly pear is made for traditional uses such as boundary hedges, fight against erosion, improvement of pastoral areas or for fresh fruit consumption. The major components of the fruit pulp are 85% of water, 10–15% of carbohydrates, and substantial amounts of vitamin C 0.025–0.030% [6]. Its nutritional value lies essentially in its glucose and fructose content (6–8%) [7]. The level of ascorbic acid is moderate (0.023%) and the acidity is low (0.06%). Prickly pear cladode can be used in many ways in

diverse sectors, utilizing different parts of the plant like the food sector and rich food. The chemical and mineral composition described by different author's shows that cactus pears have a similar nutritive value to other fruits. However, its soluble solids content reaches values greater than 16% compared to other fruits, such as prune, apricot, and peach [8,9,10]. The other components present in cactus pear pulp are protein (0.21–1.6%), fat (0.09–0.7%), dietary fiber (0.02–3.15%) and ash (0.4–1%), all of them are similar values to other fruits [11,12,13,14]. The total content of free amino acids is 257.24 mg /100 g, this value was only found in citrus and grape, and it is above average in other fruits. Also characteristic of prickly pear, in comparison with other fruits, is their high content of serine, c-amino butyric acid, glutamine, proline, arginine and histidine, and the presence of methionine [12]. The fruit has a range of colors varying from green to orange to red to purple, and this is an attractive quality parameter for consumers. Colors such as those are produced by the presence of the pigments like chlorophyll and betalain in the green and purple fruits respectively, it is certainly that this parameter makes the fruit and its products attractive; nevertheless, their stability in prickly pear products is still being studied. [15][16][17] Several researchers have quantified and identified betalaines pigments on Mexican or Spanish prickly pears [18][19][20]. Several studies show that cactus pear is a plant rich in vitamins, minerals, amino acids and sugars. It is used as food for his nutritional capacity, medical, cosmetic and production of cochineal. The cactus pear has been and continues to be made in an attempt to better use this species, which has been considered attractive for centuries [21][22] Other studies have shown that the cladode juice is rich in polyphenols. Polyphenols have been studied for their protective effects against pathogenic bacteria and viruses infecting plants or UV radiation. Such as antioxidants, polyphenols have the ability to trap free radicals generated continuously by the body or formed in response to attacks on our environment (smoking, pollution, infections, etc.) [23]. The fruit production of the prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) was a long marginalized, but now it is on increase, given a socio-

economic and environmental importance of this culture. These fruits are rich in vitamin C, betalaines (pigments), phenolic compounds, reducing sugars and minerals [20][24]. In this context, the objective of this work is the identification of some polyphenols which can be present in the juice and cladodes of different cultivars in different Moroccan regions and the evaluation of their antioxidant powers. Actually in Tunisia and in other Mediterranean countries, cactus pear plant grows spontaneously and consumed exclusively as fresh fruit and cladodes as an animal feed complement. Only a small quantity is being used for processing; so, there is need to create a better outlet for seasonally surplus production which used in animal feeds or otherwise go to waste. The actual trend to find new sources of dietary fiber and natural antioxidant such as agronomic by-products that have traditionally been undervalued was more important. In this context cladodes from *Opuntia ficus indica* f. plant could be a great source of bio-molecule such as dietary fiber, mineral and natural antioxidant compounds. In the literature the available data have been especially concerned general physicochemical composition and processing of pulp and seeds [25,26]. The culture of *Opuntia* exists almost in all regions of the country with relatively variable area; it occupies an estimated area with about 54,530 ha, representing 11.07% of the total area of the fruit trees [4]. Its geographical distribution is quite large since it found both in coastal areas from Sidi Ifni in the South to Tangier in the North, as in several continental regions [4]. The best plantations are located in coastal areas and more specifically in the coastal strip of more than 10 km wide undergoing maritime influence, the plant benefits the night and morning fog, very frequently in this area throughout year [4][27]. The cactus has been largely ignored by scientists until the beginning of 1980; this renewed interest is partly attributed to the multifunctionality of prickly pear fruit. Recent studies have revealed their high levels of certain chemical compounds, which can make this fruit an added nutritional value, such as taurine, calcium, magnesium, phenolic compounds and betalains [28][29]. In Morocco, the new strategy of agricultural development concretized by the Green Morocco Plan (PMV) is a real opportunity for the development of different sectors related to cactus, knowing that the PMV provides the consecration of a million hectares fruit species requiring little water, such as olive, carob or cactus [27]. The area reserved for the latter in each region will experience a remarkable increase, especially in the Guelmim-Smara and Rhamna regions with additional 70,000 and 50,000 ha respectively. Moroccan cactus has a very high genetic variability, several cultivars exist [27], and are distinguished by the flowering period (early, late), the flower color (yellow, orange and pink), fruit color and pulp (green, yellow, orange, red and purple), fruit shape (oval, round or oblong), the organoleptic characteristics of fruit [4] and the antioxidant content[30][31]. The fruits of the prickly pear exhibit both intra-site and inter-site variability in the shape, color, weight, sugar, acids, antioxidants, etc. These parameters vary from one cultivar to another and are strongly influenced by the environment [32]. In this context, we are interested in the study of antioxidants (polyphenols, flavonoids and cladode juice of both cultivars (spiny and spineless) in the regions of tadla Azilal and ourdigha.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. PLANT MATERIAL

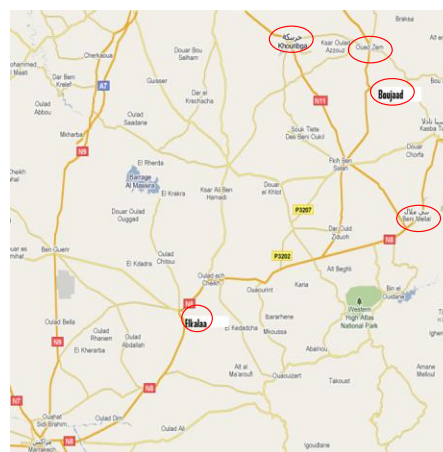
The cactus pear cladodes were collected in July (2012) in different regions (Kouribga, Beni mellal, Bejaad, Oued Zam, and Kelaa) in central Morocco (Fig.1). They were repeatedly washed with distilled water to remove dirt particles and they were cut into cubes of 2 cm.

SAMPLING SITES

The fruit samples were collected from five different sites in their relief and climate; Tadla Azilal, Chaouia Ourdigha had a maritime influence, located at 100 km from the sea and 200 km southwest of the Marrakech city and Asgherkis a continental site located at 709 m of altitude, and 57 km in the south of the Beni mellal City (70 km from khouribga) (Fig. 1).



Fig. 1: Sampling regions of cactus pear cladodes



The samples of this study are 3 linked cladodes (R1, R2 and R3), differing in age and height (Fig.2). Cladodes were washed and peeled. Pulp and juice were separated by centrifugation. The juice obtained was pasteurized and stored at -20°C until analysis.



Fig.2: Linked Cladodes of cactus pear

2.2. CHEMICAL ANALYSIS

Moisture, total ash, Titrable acidity, and degree Brix were determined according to methods AOAC [33]; The sugar content of the juice was determined using a refractometer (DIGIT 032), the results are expressed as Brix. The free acidity, expressed as a percentage of citric acid is determined by titration; 10 ml of the juice of prickly pear was placed in a 100 ml beaker equipped with a magnetic stirrer, 20 ml of distilled water was added and the homogenized mixture is titrated with NaOH (0.1 N) to pH = 8.1 [34]; The proximate analyses of the samples for moisture AOAC [33] crude fat and total ash were carried out in triplicate

POMOLOGICAL CHARACTERISTIC

In this research work, forty morphological traits were investigated and analyzed including plant weight, length, ratio L/W, width of cladode for tree position (R1, R2, R3)

ASHES

Samples weighing approximately 10 g of each dried fruit cladode were placed in previously weighed porcelain crucibles. The samples were then carbonised over a Bunsen burner and placed in a muffle furnace where they were heated to 550 °C, left at this temperature for 2 h and then transferred to a desiccators containing silica gel. After reaching room temperature, the crucibles containing the samples were weighed to determine the ash content by difference. Again, there were tree repetitions (n = 3).

SOLUBLE AND INSOLUBLE DIETARY FIBER DETERMINATION: CRUDE FIBER: DIETARY FIBER

The dietary fiber estimation was done by an enzymatic gravimetric method Asp [35] with some modifications [36]. To 5 mL of juice 20 mL of sodium phosphate buffer (pH 6.0) was added and homogenized, followed by the addition of alpha-amylase, protease and amyloglucosidase. After a filtration, the residue and filtrate have been used to determine insoluble and soluble fiber respectively. The residue was washed with water, then with acetone. It was then dried in oven at 40°C for 1 hour and 105°C for 30 min and weight. The filtrate was precipitated in ethanol followed by a filtration, centrifugation and washed with ethanol and then with acetone. It was then dried in oven at 40°C for 1 hour and 105°C for 30 min and weight.

2.3. POLYPHENOLS CONTENT

Total polyphenols content was determined by the Folin-Ciocalteu reagent according to the method [37]. The amount of total polyphenols was measured at 750 nm by spectrophotometry (S2100 Diode Array) and it was calculated as equivalent Gallic acid which is used as standard at a concentration of 0.1 mg/mL [38]. A dilution of 1/10 was made followed by a centrifugation 8000tr / min for 7 min at 4 °C, and 0.5 mL of the juice was mixed with 2.4 mL of a solution of methanol and demineralized water (50:50), 2 mL of sodium carbonate 2% (Na₂CO₃), and 0.1 mL of Folin-Ciocalteu reagent. After incubation at room temperature (25 °C) for 60 min, the absorbance was measured at 750 nm (S2100 Diode Array). The concentration of total polyphenols is expressed as Gallic acid per 100 ml of juice.

2.4. TOTAL FLAVONOIDS

Total flavonoids were done by the method of Dowd as it was adapted by [39]. Flavonoids composition was calculated by spectrophotometry. This method is based on the formation of a complex flavonoid-aluminum, with a maximum absorbance at 430 nm. Rutin was used for the calibration range. Thus, 1 mL of the juice cladode was diluted at 1/20 with MeOH-water juice (1:1), and mixed with 1 mL of a methanolic solution (2% aluminum chloride). After incubation for 15 minutes at room temperature, the absorbance was measured at 430 nm, and the results are expressed in mg/g of rutin.

2.5. IDENTIFICATION OF POLYPHENOLS BY HPLC

The identification of polyphenols on juice cladodes was determined by HPLC analysis using a system (1100 series HPLC system with diode array detector) coupled to a computer (HP ChemStation) and a thermostat control. Phenolic compounds in the samples were quantified using standard curves of standard solutions injected into the HPLC. The analysis conditions are made with a C18 column Nucleodur (particle size 5 microns, L = 250 mm, d = 4, 6 mm) maintained at 30 °C. The flow rate was 1.0 mL / min and the injection volume was 5 µL. The samples were thermostated at 15 °C to avoid their degradation. The eluent type used was: Solvent A: 95% v / v water HPLC quality and 5% v / v formic acid; Solvent B: 80% v / v / v acetonitrile, 15% v / v / v water quality HPLC and 5% v / v / v formic acid.

2.6. ANTIOXIDANT ACTIVITY ASSESSMENTS

2.6.1 DETERMINATION OF THE FREE DPPH RADICAL SCAVENGING EFFECT

The DPPH assay was done according to the method of [40] prepared with some modifications. It involves measuring the ability of the extract to trap the free radical DPPH•. To 100 µL of diluted juice with methanol-water (1/1), 2 mL of the methanol solution of DPPH 0.1 mol/L was added. After incubation for 30 minutes at room temperature (25 °C) protected from light, the absorbance was measured at 517 nm. From the absorbance measurements, the percentage of inhibition of DPPH is calculated. This percentage is plotted as a function of the concentration of polyphenol to obtain EC₅₀ (amount of antioxidant required to reduce the absorbance of 50%). The results are

expressed relative to Trolox. DPPH• radical scavenging capacity was calculated using following equation: Scavenging activity (%) = (Absorbance of Blank - Absorbance of Sample / absorbance of the blank) x 100.

2.6.2. ANTIOXIDANT CAPACITY DETERMINATION BY FRAP ASSAY

The FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) assay was done according to Benzie and Strain (1996) measured by FRAP reagent. 40µL of the juice was diluted with MeOH-water (1: 1) to which is added 0.2 mL of distilled water and 1.8 mL of reagent FRAP. After incubation at 37 °C for 10 min, the absorbance was measured at 593 nm. To evaluate the reduction of iron, a calibration curve was developed by different concentrations of FeSO₄·7H₂O (300-1100µmol). The results are expressed in mmol Fe²⁺ / L.

2.6.3. ANTIOXIDANT CAPACITY DETERMINATION BY TEAC ASSAY

The antioxidant capacity method according to TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) test or ABTS was done by the method [41]. 7 mM of ABTS•+ (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) was made in demineralized water and 2.45 mM solution of potassium, they were mixed with a ratio of 1: 0.5. The mixture was allowed to stand protected from the light at room temperature for 12 to 16 hours. The solution was diluted with ethanol to get an absorption of 0.700 (± 0.020) at 734 nm. The working solution was prepared by mixing 1.0 mL of diluted ABTS•+ solution with 10 µL of the cladode extract and the absorbance was measured after 30 min of incubation at 734nm. The antioxidant capacity was expressed as Trolox equivalent as µM or mM Trolox equivalent per gram or per milliliter.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. MORPHOLOGICAL AND CHEMICAL COMPOSITION

The result of The cladode weight, width, ratio L/W and length from different areas were summarized in the Table.1. Most of the data points are grouped at the bottom, that is, at low fruit weight for the Tadla azilal city (247757g) and the higher weight (Table.1). While the Higher length founded for Tadla azilal city (25-34cm) and 1,8-2,08 for L/W the lower cladode is for Haouz city with 14-19,5cm for length and the ratio was 1,50-1,77 (Table.1). In addition, intercomparizon of the spiny and spineless cladode (Khouribga) it was noted that for the spiny the ratio L/W is lower (1,42-1,78) than the spineless cladode (1,73-1,94). Table 1 summarized the general composition of spiny and spineless cladodes juice from different region and position. The results showed that the juice content in cladodes varies depending on the regions ranging from 19.75 to 69.68 mL/100g (Table.1). The pH was intermediate (4.51-5.83). The acidity was low and was around 0.40 Equivalent citric acid (g/L). It can be explained by the presence of many organic acids as malic, citric and oxalic acids [42] as salts form. The juice had higher percentages of crude fiber, total ash. Indeed, [43] reported a pH value of 4.6 for cladodes of *O. ficus indica* f. *amylocea* and *O. ficus indica* f. *inermis* cultivated in Mexico. Water activity of fresh cladodes was about 0.76 for the two varieties. pH and aw value of cladodes could prevent bacteria development but could not prevent moulds and yeast development [44]. Ash contents observed in this study were higher than value reported by [43] and [45] and

then higher of Aloe leaves (15,48%) (A. Gulia, 2010)[46] The two varieties of cladodes exhibit a low pH value. This low pH could be explained by the presence of many organic acids as malic, citric and oxalic acids [42]. Indeed, [43] reported a pH value of 4.6 for cladodes of *O. ficus indica* f. *amylocea* and *O. ficus indica* f. *inermis* cultivated in Mexico. Water activity of fresh cladodes was about 0.76 for the two varieties. pH and aw value of cladodes could prevent bacteria development but could not prevent moulds and yeast development [44]. At the Ouardigha site, the average pH of the cladode juice was 4,62-5,51 for the Khouribga , Ouedzam and Boujaad population and 4,68-5,58 for the Kelaa one, 4,65-4,75 for Beni Mellal one. The citric acid values comprised between 0.32g/l and 0,42 g/l were significantly different (Table 1), these results are with agreement with data reported in the literature (0.05–0.18).

SUGAR CONTENT

For the Haouz site the Kelaa population cladode juice have an average sugar content of 5,9-6,1 Brix higher than other population from other site (Table.1). The lower content were enregistred for chaouiya ouardigha and Tadla Azilal with Beni Mellal, Kouribga and Boujaad population (3,2; 3,7 and 4,2) respectively. On the other hand, the intra-site comparison (for spiny and spineless) showed that the average sugar content of the two cultivars was statistically different for the Khouribga spineless Ouardigha site, while analysis of variance showed a significant difference between these two cultivars. Total dietary fiber, soluble dietary fiber and insoluble dietary fiber were calculates according to the method described by Prosky et al. (1988)[47]. The content of dietary fibers was higher for spiny cladodes compared to spineless cladodes (Table.2). The total fibers varies depending of regions with respectively FAT (Khouribga: 58,2%) for spinless and spinly cultivar (66,18), FAT (Ouad-Zem:58,62%) for spinless, FAT (Beni Mellal:54,90%) , FAT (Boujaad:53,86%) and FAT (Elkalaa:53,62%). Spiny cladodes of the different site were richer in FAT than spineless cladodes. These result were higher than crude of Aloe leaf [46] and FAT content of those reported by M.A. Ayadi et al [48] for Tunisian cladodes and Saenz [49] for Mexican cladodes. For the two Tunisian varieties of cladodes, FAI amount was higher than FAS amount. The ratio of FAS/FAI was 1:3 was similar that the value as reported by [48] but lower that the value reported by [49] while the FAS/FAI ratio is 1:2 in Mexican cladodes.

COCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CLADODE JUICE OF PRICKLY PEAR FROM DIFFERENT LOCALITIES

Regions	Cultivars	Cladodes position	Length (cm)	Width (cm)	Ratio L/W	Weight (g)	Juice content ml/100g	pH	Titration acidity Equivalent citric acid (g/L)	Ash (g/100g of dry matter)	Degrees Brix (°Bx)
Khouribga A	Spiny	R3	38.50	23.00	1.67	2683.20	19.75	4.62±0.015	0.42±0.01	25.43	3.7
		R2	32.00	18.00	1.78	1443.30	30.49	4.45±0.011	0.41±0.02	25.23	4.5
		R1	22.00	15.50	1.42	710.40	52.79	4.71±0.03	0.41±0.015	25.16	4.4
	Spineless	R3	32.00	18.50	1.73	2265.70	39.06	4.48±0.026	0.38±0.011	22.21	4.5
		R2	30.00	17.00	1.76	1213.50	32.55	5.15±0.011	0.39±0.011	22.12	4.2
		R1	30.00	15.50	1.94	863.40	31.27	4.61±0.015	0.38±0.01	22.01	4.3
OuadZem A	Spineless	R3	42.00	23.00	1.83	2299.30	58.50	5.2±0.05	0.36±0.03	21.32	5.7
		R2	30.00	17.50	1.71	968.50	62.98	5.51±0.026	0.37±0.012	21.22	6.00
		R1	27.00	14.00	1.93	559.70	69.68	4.98±0.08	0.34±0.02	21.13	5.3
Boujaad A	Spineless	R3	39.00	20.00	1.95	1176.70	50.99	5.2±0.1	0.37±0.013	20.25	3.9
		R2	30.5	19.50	1.56	874.20	52.62	5.83±0.01	0.37±0.013	20.76	4.3
		R1	33.00	17.50	1.89	610.90	49.11	5.77±0.01	0.33±0.03	20.23	4.5
Elkalaa B	Spineless	R3	34.50	19.50	1.77	1717.7	39.59	4.68±0.02	0.36±0.04	21.27	5.8
		R2	32.14	18.50	1.74	1151.20	52.12	5.21±0.026	0.36±0.012	21.22	6.1
		R1	21.20	14.00	1.51	399.80	68.78	5.38±0.021	0.37±0.013	21.26	5.9
Beni Mellal C	Spineless	R3	34.00	16.50	2.06	757.60	60.45	4.94±0.005	0.36±0.02	21.29	3.2
		R2	27.00	15.00	1.80	603.00	43.12	4.65±0.017	0.32±0.021	21.28	3.4
		R1	25.00	12.00	2.08	247.00	56.68	4.75±0.025	0.35±0.013	21.22	3.2

ZONE A: OUARDIGHA, ZONE B: HAOUZ, ZONE C: TADLA AZILAL LOCALITIES

TABLE 2: AMOUNT OF SOLUBLE (FAS), INSOLUBLE (FAI) AND TOTAL FIBER (FAT) FOR THE SPINLY AND SPINLESS CLADODES CULTIVAR FROM DIFFERENT LOCALITIES

Cultivars	Cladode position	Dietary insoluble fiber (FAI) %	Dietary soluble fiber (FAS)%	Dietary total fiber (FAT)%	FAS/FAI
Khouribga zone A	spinly	49,71±0,84	16,46±0,14	66,18±0,7	0,33
	Spinless	45,45±0,77	13,17±0,04	58,62±0,81	0,29
Oued Zam zone A	Spinless	43,33±0,24	12,30±0,06	55,63±0,18	0,28
Boujaad zone A	Spinless	41,44±0,01	12,42±0,13	53,86±0,12	0,30
Elkalaa zone B	Spinless	41,33±0,37	12,29±0,1	53,62±0,27	0,297
Beni Mellal zone C	Spinless	42,49±0,33	12,42±0,004	54,90±0,33	0,292

ZONE A: OUARDIGHA, ZONE B: HAOUZ, ZONE C: TADLA AZILAL LOCALITIES

3.2. POLYPHENOLS CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

Phenolic compounds, also called polyphenols, are metabolic products widely distributed in plant foods; they have many biological and pharmacological properties that could provide protection against chronic disease. These compounds have more antioxidant effect than vitamins, they are able to neutralize the effects of oxidative free radicals [50]. Analysis results shown in Table.3 indicate that the concentration of polyphenols varies depending on the nature of the position of cladodes (R1, R2 or R3). According to the exposure and geographical location of cladodes, the concentration of polyphenols varies. It gradually decreases from R1 to R3. Polyphenols content in cladode juice of the cultivar localized in Haouz site with Elkalaa cultivar reached 477.95 ± 0.12 mg Gallic acid/L (R1), it is the highest value compared to other cultivars: $269,11 \pm 0.10$ mg Gallic acid /L (Khouribga), $269,11 \pm 0.10$ mg Gallic acid/L (Oued Zem), $263,84 \pm 0.13$ Gallic acid/L (Boujaad), and $253,19 \pm 0.08$ mg Gallic acid/L (Beni Mellal). A significant difference in polyphenols content was registered between the spiny and spineless cultivars in the two site Tadla azilal and Chaouia ouardigha. Indeed, the spiny cladodes of Khouribga contain

a higher amount of polyphenols than the spineless variety from the same region. This change in content of polyphenols is related to the physiology of spiny cladodes, allowing them to conserve Ouadigha Sahel cladode fruits have an average content of polyphenols of 273-293mgGAE/g for Khouribga, 263-269GAEmg/L for Oued zem and 254-263mgGAE/L Boujaad cultivars respectively. While in the Haouz site, this content is in the range of $477.95 \pm 0,12$ mgGAEg/L to $458,55 \pm 0,30$ mg GAE/l. However for the Tadla azilal site, this content is in the range $171,12 \pm 0,30$ to 253.19 ± 0.08 mg GAE/l for Beni Mellal cultivar (Table.3). This difference between the tree sites is the result of the effect of a number of factors, the main ones being genetic, precipitation, light, topography, soil type and maturity as reported by Harris and Karmas [51]. The mean content of polyphenols comprised between 289.39 and 447.27mg/g is higher than those indicated by Chavez-Santoscoy [52] who determined the values of 55.4–226.3mg/g of nine varieties of Opuntia. Our results are identical to those found on the peach, plum and nectarine ranging from 91 to 1042mg/g after thanks to polysaccharides [42].

TABLE 3 ASSESSEMENT OF POLYPHENOLS CONTENT IN CLADODE JUICE OF OPUNTIA FICUS INDICA

Regions	Cultivars	Cladodes position	total polyphenols (mg gallic acid / L of juice)	Flavonoids content mg RE/L of juice
Khouribga A	Spiny	R1	396.17 ± 0.49	299.48 ± 0.15
		R2	283.76 ± 0.29	91.53 ± 0.13
		R3	276.04 ± 0.09	89.56 ± 0.70
	Spineless	R1	367.64 ± 0.06	308.63 ± 0.60
		R2	251.69 ± 0.08	100.73 ± 0.50
		R3	251.76 ± 0.07	123.06 ± 0.40
OuedZem A	Spineless	R1	269.11 ± 0.10	201.98 ± 0.28
		R2	269.95 ± 0.15	83.35 ± 0.33
		R3	249.23 ± 0.14	90.04 ± 1.12
Boujaad A	Spineless	R1	263.84 ± 0.13	144.40 ± 0.33
		R2	262.02 ± 0.13	122.22 ± 0.15
		R3	254.68 ± 0.08	92.34 ± 0.38
Elkalaa B	Spineless	R1	477.95 ± 0.12	282.86 ± 0.44
		R2	459.59 ± 0.20	84.56 ± 0.53
		R3	458.55 ± 0.30	82.94 ± 0.46
Beni Mellal C	Spineless	R1	253.19 ± 0.08	148.99 ± 0.36
		R2	227.95 ± 0.13	137.62 ± 0.42
		R3	171.12 ± 0.15	80.93 ± 0.28

ZONE A: OUARDIGHA, ZONE B: HAOUZ, ZONE C: TADLA AZILAL LOCALITIES

Besides Phenolic acids , Cladode juice contain quite a lot more of flavonoids compounds, being also able to contribute to the antioxidant activity. To give a rough estimation, photometric determination of the flavonoids content was carried out The cladode juice of cactaceae is rich in flavonoids (Table 3) compared to cladode juice of different areas and position of cladode, a difference significative was observed with 160,19mg RE/l of juice for Ouardigha site (khouribga 125,12±0,33mg RE/l oued zem ; 119,98mg/l boujaad) and Haouz site(; 150,12mg RE/l for Kelaa) and tadla azilal site (122,51mg RE/l juice cladode) for Beni mellal population. In the oder hand , Similarly, in relation to flavonoids (Table.3), a difference in the concentration was noticed between juice cladode from different position(R1, R2 or R3) and this concentration gradually decreases from R1 to R3 in all cultivars for all site. The antioxidant activity of the MeOH extract fractions of cladode juice cactaceae was assessed by measuring their

ability to scavenge DPPH radicals. The samples were able to inhibit the activity of DPPH radical. While this antiradical activity depends on the regions, cladodes extract has a very important antioxidant activity. Thus, for the region of ELKELAA, antioxidant activity for cladodes in R1 position is higher than R2 which is higher than R3 (Table.4). The analysis of Table 5 indicates that there is a correlation between polyphenols and antioxidant activity (FRAP), which marks the availability of antioxidant compounds. In addition, a correlation between flavonoids and antioxidant activity (FRAP) was observed, most flavonoids have an antioxidant activity. Similarly, another correlation between polyphenols and flavonoids was observed because the most of polyphenols are flavonoids. The TEAC method is well correlated with FRAP method. It was reported that polyphenols in fruit juice was 642, 28 mg/L, and TEAC 18, 61 mmol/L [42]. However polyphenols in our fruit juice was 171,12 - 396,17mg/l and TEAC 15,37-18,31 mmol Fe2+/L.

TABLE 4 ANTIOXIDANT CAPACITY OF CLADODE JUICE OF PRICKLY PEAR

Regions	Cultivars	Cladodes Positions	FRAP (mmol/L F ²⁺)	DPPH (mg/L)	TEAC (mg/L)
Khouribga A	Spiny	R1	12.19±0.01	47.38±0.20	4583.20±1.55
		R2	11.05 ±0.01	46.06±0.22	4578.43±1.56
		R3	10.23 ±0.00	44.72±0.25	4541.43±1.60
	Spineless	R1	11.99 ±0.01	44.08±0.21	4491.80±1.58
		R2	10.40 ±0.01	43.99±0.19	4448.15±1.45
		R3	9.53 ±0.02	43.41±0.22	4423.59±1.60
OuardZem A	Spineless	R1	10.19 ±0.01	46.99±0.24	4538.87±1.64
		R2	9.90 ±0.01	45.72±0.21	4514.65±1.52
		R3	9.40± 0.01	44.38±0.21	4506.43±1.45
Boujaad A	Spineless	R1	9.26 ±0.00	46.67±0.23	4087.66±1.26
		R2	8.40± 0.01	46.6±0.20	4013.14±1.25
		R3	8.26 ±0.02	45.73±0.23	3838.35±1.44
Elkalaa B	Spineless	R1	13.19 ±0.01	70.21±0.21	4654.83±1.23
		R2	11.41 ±0.02	65.5±0.24	4650.90±1.66
		R3	9.25 ±0.02	61.8±0.22	4639.31±1.75
Béni Mellal	Spineless	R1	8.25 ±0.01	46.39±0.21	3853.53±1.25
		R2	8.11 ±0.02	41.08±0.21	3847.05±1.22
		R3	6.69 ±0.01	40.51±0.23	3847.39±1.65

ZONE A: OUARDIGHA, ZONE B: HAOUZ, ZONE C: TADLA AZILAL LOCALITIES

A correlation was observed between the content of flavonoids and total polyphenols of our extracts and with antioxidant activity. The majority of the antioxidant properties of these plants are due to their polyphenols. Several studies have shown in the literature that the cactus is rich in polyphenol. The most of those studies are focused on flavonoids and seen their importance to our overall health. Indeed, Other reports indicated that the plants of the Cactaceae family contain flavonol 3-O-glycosides (quercetin, kaempferol, and isorhamnetin), dihydroflavonols, flavonones, and flavanonols [53,54]. These results are correlated with the cactus polyphenols HPLC analysis (Fig.3).

TABLE 5 COEFFICIENT OF DETERMINATION R² BETWEEN THE TOTAL POLYPHENOL CONTENT, FLAVONOIDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY BY THE THREE METHODS (DPPH, TEAC, FRAP).

	Total polyphenols content (mg GAE/L cladodes juice)	Flavonoids (mg RE/l cladodes juice)	DPPH	TEAC	FRAP
Total Polyphenols content mg GAE/L cladodes juice	1	-----	-----	-----	-----
Flavonoides (mg RE/l cladodes juice)	0.71	1	-----	-----	-----
DPPH	0.22	0.32	1	-----	-----
TEAC	0.56	0.69	0.60	1	-----
FRAP	0.89	0.86	0.46	0.81	1

3.3. Phenolic acid profiles

The revealed antiradical activity of the extract and fractions of Cladode juice of two cactaceae has guided its phytochemical analysis, in order to isolate the compounds that could be related to this bioactivity. Based on the correlation between polyphenolics and antioxidant activity [55][56] we searched for these compounds in the MeOH extract and MeOH/eau fractions of cladode juice of cactaceae, by analyzing their TLC polyphenolic profiles in two different mobile phase systems and UV (254 and 365 nm) and NP/PEG/UV, a stain used for flavonoids and phenolic acids. The phenolic acid profiles in cladode juice of different regions are presented in Table 6. The content of catechin acid is the highest (54,68µg/ml) than other polyphenolic compounds 17,58µg/l for Isoquercitrine ; 15,58µg/m for quercetrine ; 13,37µg/ml for Epicatechin and 12,15µg/ml for rutin. The aqueous methanolic extracts of cladode fruit, HPLC– DAD analyses were carried out (table.6).. The concentrations of flavonols in the present cladodes are comparatively lower (25,52µg/ml for isoquercetrine, 16,57µg/ml for quercetrine) than those found in cladodes from Italy (4.8 mg/g) [57], as well as the cladodes from Mexico (1.1–3.5 mg/g) [58]. While the concentration of acid phenol (17,16 µg/ml for Epicatechin, 15,85µg/ml for catechin and 5,42µg/ml for Gallic acid) (Table.6) and Figure.3. The results obtained here in underline to some extent those obtained [57] and [59] from cactus *O. ficus-indica* cladodes collected from Italy and Mexico, respectively. It have been [59] detected in cladodes from two different cultivars from *O. ficus-indica* separately; Ginestra et al. (2009)[57] detected them in a whole mix of three different cultivars from *O. ficus-indica* cladodes. Both studies illustrated that cactus *O. ficus-indica* cladodes are characterized with mainly isorhamnetin derivatives. In contrast, Guevara-Figueroa et al. (2010)[58] detected isoquercitrin, isorhamnetin-3-O-glucoside, kaempferol- 3-O-rutinoside, rutin and isorhamnetin-3-O-rutinoside in two commercial and three wild varieties of *O. ficus-indica* cladodes cultivated in Mexico. Further, they reported that the most abundant flavonols were kaempferol-3-O-rutinoside and isorhamnetin-3-O-rutinoside.

Table.6 Concentration of phenolic compound in methanolic extracts of cladode juice (µg/ml of cladode juice)

Molecules	MeOH		
	Time retention	Air	Concentration (µg/ml)
Gallic acid	4.456	3.8	0.14
Catechin	18.08	355.01	54.68
Epicatechin	39.6	101.71	13.37
Hyperoside	55.52	14.55	0.65
Isoquercitrin	56.47	377.6	17.58
Quercitrin	58.7	277.8	15.58
Phlorizin	59.26	57.78	2.9
Rutin	57.41	198.33	12.15
Quercetin	65.21	7.91	0.21

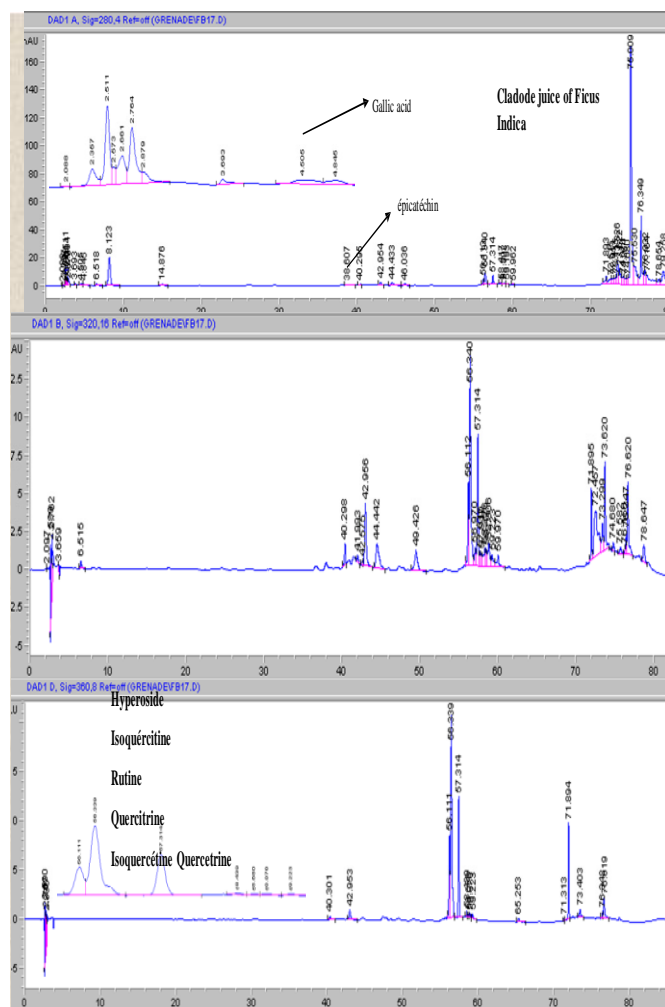


Fig.3 : Chromatograms of juice cladodes of *Opuntia ficus-indica*

The results obtained in the present study showed that kaempferol ,isorhamnetin-3-O-glucoside, kaempferol- 3-O-rutinoside, rutin and isorhamnetin-3-O-rutinoside was not found at all. The concentrations of flavonols in the present cladodes are comparatively higher (6.3–7.3 mg/g DW) than those found in cladodes from Italy (4.8 mg/g)[57], as well as the cladodes from Mexico (1.1–3.5 mg/g) [58]. Further, the level of aglycon reported herein by enzymatic hydrolysis is significantly higher than that reported [59] Studies reported that flavonol formation might be accelerated by increased sun light exposure. For instance, Price, Breen, Valladao, and Watson (1995)[60] investigated the impact of sun exposure level on the concentration of flavonols in wine and reported that quercetin glycosides had 4.5, 14.8, and 33.7 mg/L in wines produced from shaded, moderate, and highly light exposed grapes, respectively. Further, Stewart et al. (2000) [61] investigated the influence of location on the flavonols in twenty different varieties of tomatoes. They reported that the highest concentrations of flavonols were found in tomatoes originating from warm sunny climates in Spain and Israel. Schirmmacher, Schnitzler, and Graßmann (2004)[62] mentioned also that flavonoid contents were higher in field-grown plants than those in greenhouse-grown plants. This might explain the increase in flavonol levels in cactus fruits from South Africa compared to fruits

from Egypt and Sicily. As already mentioned, information about specific cultivation practices was not available, but it was tried to get/collect the full colored fruits at an approximate similar maturity and ripening stage. They also identified two other compounds as Phlorizine and hyperoside derivatives.

4. CONCLUSION

The physico-chemical study showed that the titrable acidity and water content did not differ significantly between the cultivars cladode of the tree localities studied. Our results also showed that the HPLC determination of total polyphenols shows values between 0,14µg/ml and 58µg/ml of cladode juice. These results indicate that the cladode juice of different areas contain significant levels of polyphenols and specially the acidic phenols and flavonols. This study showed that fruits cladodes are very rich in polyphenols content, flavonoids, and have a remarkable antioxidant activity. The Correlation between polyphenols content and antioxidant activity can be attributed to their phenolic composition. In addition cladodes are an important source of fiber. The spiny cladodes are richer in biomolecular components compared to spineless cladodes. The use of cactus pear stems, fruits and flowers can be done in food, medicine, cosmetic, and pharmaceutical industries. Physico-chemical analysis of spiny (*O. ficus indica* megarantha and *Ficus indica*). Cladode and spineless cladodes (*O. ficus indica* f. *inermis*) obtained from cactus plant growth in Mediterranean area (Morocco) shows a great richness on bio-molecule which could be valorized by including cladodes powders in food formulation to improve nutritional, technological and stability of formulated food stuffs. Fortification of wheat flours by cladodes powders as a source of dietary fiber leads to a change in dough properties. Cladodes like any other fiber source increase water absorption capacity of the flours and consequently the dough properties

Acknowledgments

All authors thank the partial financial support from 'Faculty of Sciences and Technics', University of Sultan Moulay Slimane. The authors wish to thank the anonymous reviewers for their valuable assistance for improving the contribution.

REFERENCES

- [1] V.K..Deshpande, A.M. Joshi, Cactus (*Opuntia dillenii* Graham) stem: a new source of energy, *J. Power*, 47,185–188, (1994).
- [2] H..Han, P. Felker, Field validation of water-use efficiency of a CAM plant *Opuntia ellisiana* in south Texas, *Journal of Arid Environments*, 36, 133–148, (1997).
- [3] N.Chougui, H..Louaileche, S. Mohedeb, Y. Mouloudj, Y.. Hammaoui, A. Tamendjari, Physico-chemical characterization and antioxidant activity of some *Opuntia ficus-indica* varieties grown in North Algeria, *Afr. J. Biotechnol.*, 12, 299-307.,(2013).
- [4] M..Boujnah, L. Chajja, Genetic variation within different Cactus ecotypes of Moroccan origin. IVth internat. Congres Cactus Pear and Cochineal and the IVth

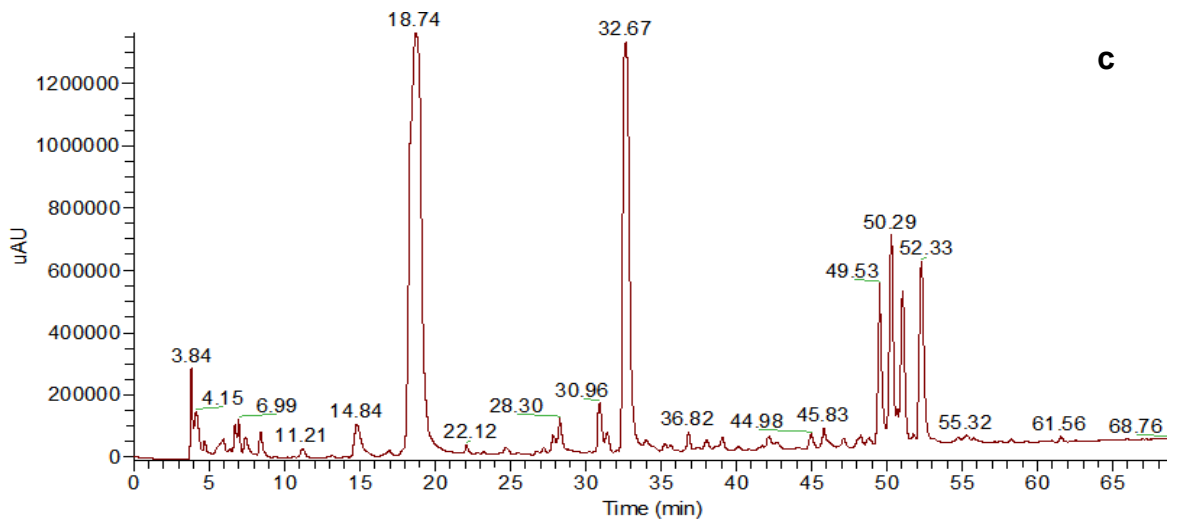
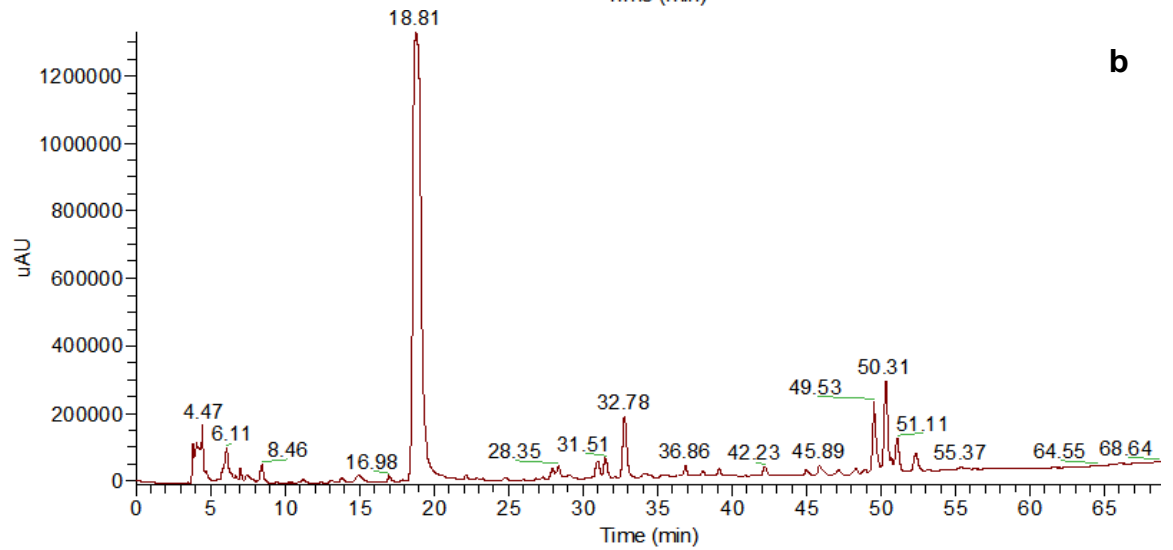
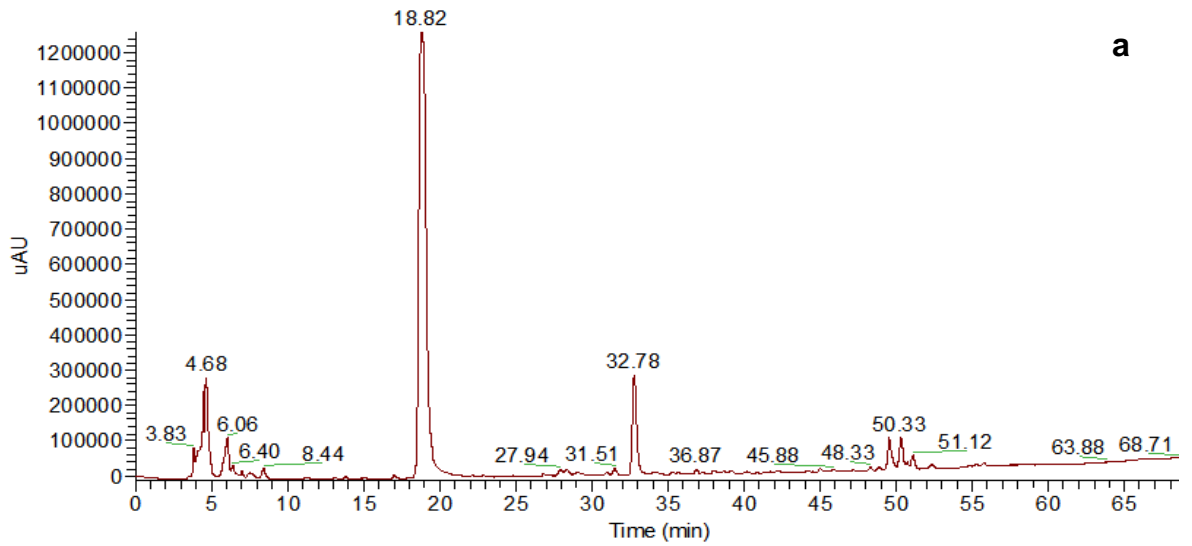
general Meeting FAO-CACTUSNET. Hammamet, Tunisie, (2000).

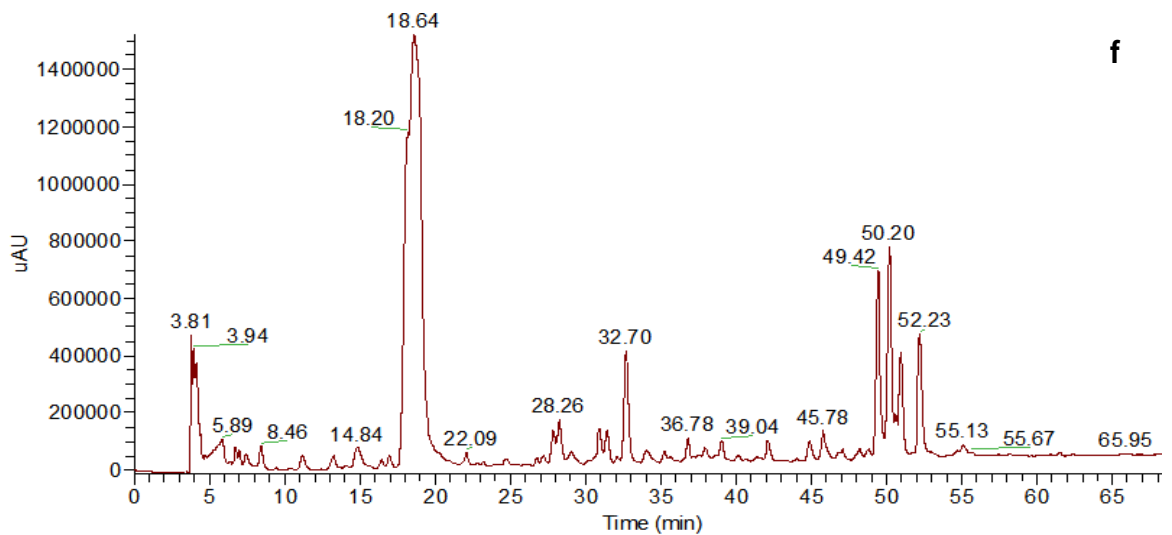
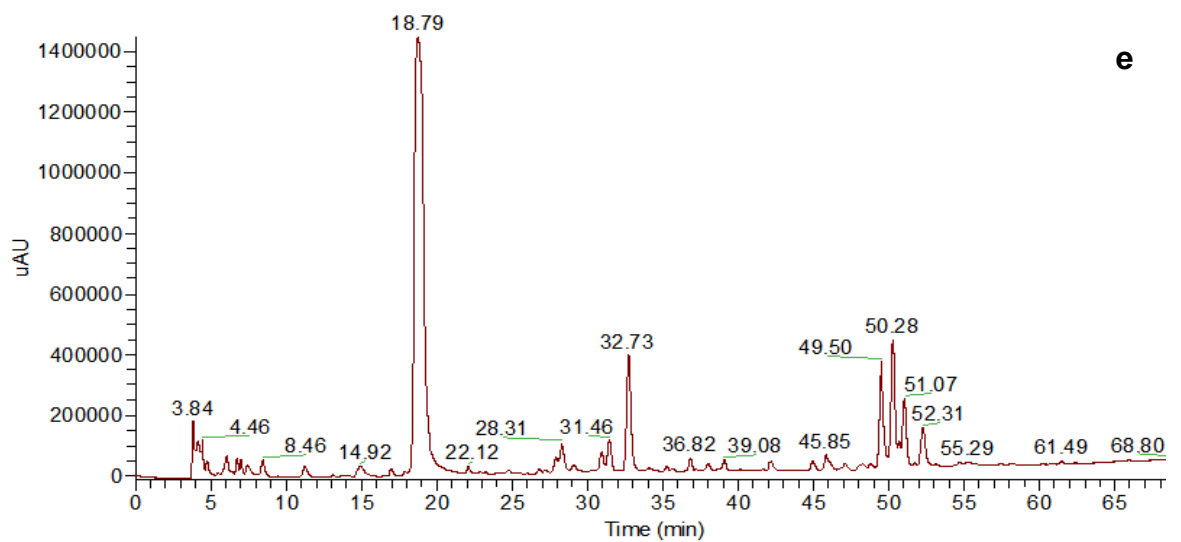
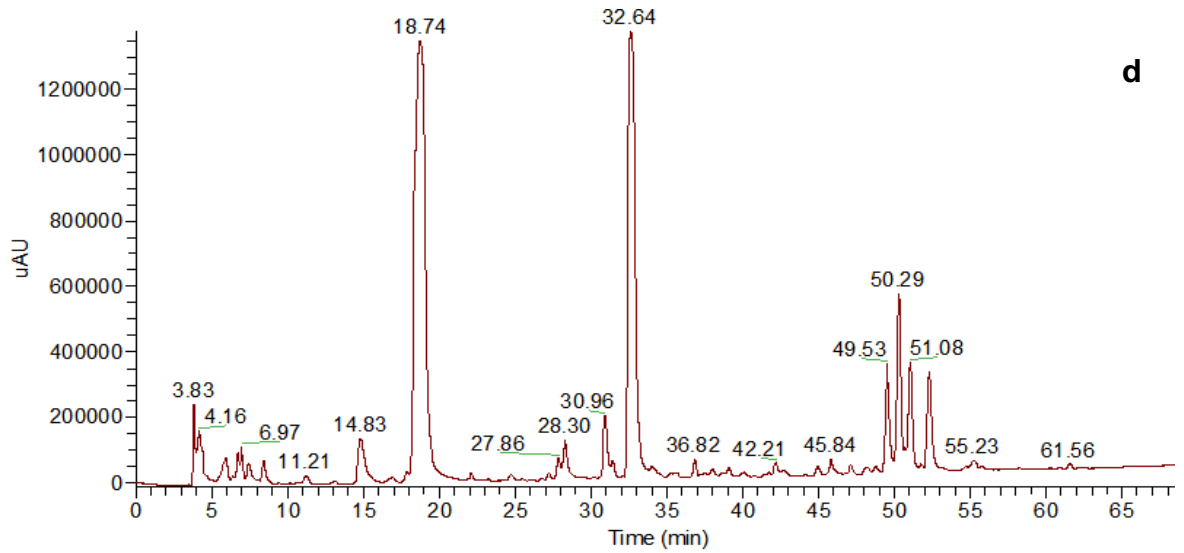
- [5] M..Arba, Dellahia a cactus pear cultivar from the Mediterranean coast of northern Morocco.*Acta horticulturae*, 728, 37-41, (2006).
- [6] S. Gurrieri, L. Miceli, C. M..Lanza, F. Tomaselli, R. P. Bonomo, & E. Rizzarelli, Chemical Characterization of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) and Perspectives for the Storage of Its Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5424-5431, (2000).
- [7] Y. Habibi, M.. Mahrouz, M..Vignon, Isolation and structure of D-xylans from pericarp seeds of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research*, 337, 1593–1598, (2002).
- [8] E. Pimienta, *El Nopal tunero* (1st Edn). Jalisco, MeHxico: Universidad de Guadalajara, 246 pp. (1990).
- [9] H..Schmidt-Hebbel, I.. Pennacchiotti, L. Masson, & M.A. Mella, *Tabla de composicion quimica de alimentos chilenos* (8th Edn). Facultad de Ciencias Quimicas y Farmaceuticas, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 62 pp, (1990).
- [10] E. Sepuhlveda, C. SaHenz, Chemical and physical characteristics of prickly pear (*Opuntia ficus indica*) pulp. *Revista de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos*, 30, 551–555. (1990).
- [11] O.Paredes, R .Rojo, Estudio para el enlatado del jugo de tuna. *Tecnologia de Alimentos*, 8, 237–240, (1973).
- [12] A. Askar, S.K. El-Samahy, Chemical composition of prickly pear fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 77, 279–281, (1981).
- [13] W.N. Sawaya, , J.K. .Khalil, M.M. Al-Mohammad, Nutritive value of prickly pear seeds, *Opuntia ficus indica*. *Plant Foods For Human Nutrition*, 33, 91–97, (1983).
- [14] S. Rodriguez, C. Orphee, S. Macias, S. Generoso, L. Gomes GarcmHa, Tuna:Propiedades fmHsico-quimicas de dos variedades. *La AlimentacioHn Latinoamericana*, 210, 34–37, (1996).
- [15] U. Merin, S. Gagel, G.. Popel, S. Bernstein, I. .Rosenthal, Thermal degradation kinetics of prickly-pear- fruit red pigment. *Journal of Food Sciences*, 52, 485–486, (1987).
- [16] D. Montefiori, Ricerche sull'estrazione, la stabilitaH e l'impiego dei pigmenti del fico d'india sanguigno. Tesi di Laurea. UniversitaH degli Studi di Milano, Italia. 94 pp, (1990).
- [17] E. Castellanos-Santiago, E.M. Yahia, Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass

- spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 5758–5764, (2008).
- [18] J. Fernandez Lopez, A. Luis, Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits. *J. Chromatogr. A*, 913, 415–420, (2001).
- [19] Omar Khatabi 2013
- [20] F.C. Stintzing, R. Carle, Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 175–194, (2005).
- [21] F.C. Stintzing, A. Schieber, Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *European Food Research and Technology*, 216, 303–311, (2003).
- [22] A., Scalbert, G. Williamson, Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130, 2073–2085, (2000).
- [23] B.S. Maataoui, S. Hilali, Composition physico-chimique de jus de deux types de fruits de figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica*) cultivés au Maroc. *Rev. Biol. Biotechnol.*, 3 (2), 8–13, (2004).
- [24] M. Ennouri, E. Bourret, L. Mondolot, H. Attia, Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils. *Food Chem.* 93, 431–437, 2005.
- [25] M. Ennouri, H. Fetoui, E., Bourret, N. Zeghal, H. Attia, Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 1. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. *Bioresour. Technol.* 97, 1382–1386, 2006.
- [26] Z. Bouzoubaa, A.Y. Essoukrati, b S. Tahrouch, b, A. Hatimi, b S. Gharby, c H. Harhar, 2014, Phytochemical study of prickly pear from southern Morocco, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* (2014) xxx, xxx–xxx
- [27] A., Piga, Cactus pear: a fruit of nutraceutical and functional importance. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* 6, 9–22, 2004.
- [28] S. Zine, S. Gharby, M. El Hadek, Physicochemical characterization of *Opuntia ficus-indica* seed oil from Morocco. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* 10 (1), 1–7, 2013.
- [29] L. Tesoriere, M. Fazzari, M., Allegra, M., Livrea, Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of Sicilian cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. *J. Agric. Food Chem.* 53 (20), 7851–7855, 2005.
- [30] O. J., Kuti, Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chemistry* 85(4): 527–533, 2004.
- [31] Parish, P. Felker Fruit quality and production of cactus pear (*Opuntia* spp.). Fruit clones selected for increased frost hardiness. *J. Arid. Environ.*, 37 (1) pp. 123–143, (1997).
- [32] AACC, Approved Methods of the AACC, 10th ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN (Methods 08-01, 30-25, 44-15A, 46-10, 54-10, 54-21), 2000.
- [33] E.M. Medina, E.M. Rodríguez, C.D. Romero, Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food Chem.* 103 (1), 38–45, 2007.
- [34] N. G. Asp, C. G. Johansson, v H. Hallmer, & Siljestrom, M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fibre. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3, 476–482, (1983).
- [35] L. Prosky, L. Asp, T.F. Schweizer, J.W. DeVries, I. Furda, Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71 (5), 1017–1023, 1988.
- [36] V. L. Singleton, R., Orthofer, R. M., Lamuela-Raventos, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178, (1999).
- [37] A. Escarpa, M.C. Gonzalez, Approach to the content of total extractable phenol compounds from different food samples by comparison of Chromatographic and spectrophotometer methods. *Anal. Chim. Acta.*, 427, 119–127, (2001).
- [38] A. Arvouet-Grand, B. Vennat, A. Pourrat, P. Legret, Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49 (6), 462–468, (1994).
- [39] W. Brand-Williams, E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 25–30, (1994).
- [40] R. Re, N., Pellegernie, A. Proteggente, Pannala, A., Yang, M., & C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Bio. Med.*, 26, 1231–1237, (1999).
- [41] F. Stintzing, K. Herbach, M., Mosshammer, R., Carle, W. Yi, S., Sellappan, C. Akoh, R., Bunch, R., Felkers, x Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2), 442–451, 2005.
- [42] A. Rodriguez-Felix, M. Cantwell, Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (*nopalitos*). *Plant Foods Hum. Nutr.* 38, 83–93, 1988.
- [43] M. El Gersifi, les défauts des produits de pâtisserie et biscuie au cours du stockage: la prévention par la formulation. *Industrie Alimentaires et Agricole*, 82–88, 1998.

- [44] M.E.. Malainine, A. Dufresne, D. Dupeyre, M.R..Vignon, M..Mahrouz, First evidence of weddelite crystallites in *Opuntia ficus-indica* parenchyma. *Z. Naturforsch./Biosci.* 58, 812–815, 2003.
- [45] H.K. .Gulia, B.C. Sharma, A. Sarkara, A. Upadhyay,, Shitandi, Changes in physico-chemical and functional properties during convective drying of aloe vera (*Aloe barbadensis*) leaves, food and bioproducts processing 8 8 161–164, (2010)
- [46] M.A. Ayadi , W. Abdelmaksoud, M. Ennouri, H. Attia, Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making, *Industrial Crops and Products* 30 40–47, (2009)
- [47] C. Sàenz, Cladodes: a source of dietary fiber. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.*, 117–123, 1997.
- [48] F. Shahidi, P.K. Janitha, P.D. Wanasundara, Phenolic antioxidant, critical previous term reviews next term. *Food Sci. Nutr.* 32, 67–103, 1992.
- [49] R.S. Harris, E. Karmas, Nutritional Evaluation of Food Processing. The Avi Publishing Company Inc., Westport, CT, 1977.
- [50] R..Chavez-Santoscoy, J. Gutierrez-Uribe, S. Sema-Saldívar, Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Foods Hum. Nutr. (Formerly Qualitas Plantarum)* 64 (2), 146–152, 2009.
- [51] F. Burret, P. Lebreton, B. Voirin Les aglycones flavoniques des Cactées: distribution, signification. *Journal Natural Products*, 45: 687–693, (1982)
- [52] Weirong Cai , Xiaohong Gu and Jian Tan, Extraction, Purification, and Characterisation of the Flavonoids from *Opuntia milpa alta* Skin, *Czech J. Food Sci* , Vol. 28, No. 2: 108–116, 2010.
- [53] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, & D. J. Bobilya, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584, (2002).
- [54] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, & G. Paganga,. Structure-antioxidant active relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956. Paganga, (1996)
- [55] G.. Ginestra, M. L. Parker, R. N. Bennett, J. Robertson, G. . Mandalari, A. Narbad, Anatomical, chemical and biochemical characterization of cladodes from prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10323–10330, (2009).
- [56] T. Guevara-Figueroa, H. Jimenez-Islas, M. L. Reyes-Escogido, A. G. Mortensen, B. B. Laursen, , L. Linet al. x Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 525–532, 2005
- [57] L. Santos-Zea, , J. A Gutierrez-Uribe.& S. O Sema-Saldivar,. (Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7054–7061, 2011).
- [58] S. F. Price, P. J. Breen, M., Valladao, & B. T. Watson, Cluster sun exposure and quercetin in Pinot Noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 187–194, (1995).
- [59] A. J. Stewart, Bozonnet, S., Mullen, W. Jenkins, G. I., Lean, E., & , A. Grozier (2000). Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2663–2669.
- [60] G..Schirmmacher, W. H., Schnitzler, & J. Graßmann, Determination of secondary plant metabolites and

CHROMATOGRAMMES
ANNEXE 3





Chromatogrammes du jus de cladode des deux espèces, (a) : Inerme mars, (b) : Epineuse mars, (c) Inerme aout, (d) Epineuse aout, (e) Inerme janvier, (f) Epineuse janvier.

