

## THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en .....

Formation Doctorale : Chimie Appliquée et Environnement

Spécialité : Chimie des Substances Naturelles

Sous le thème

# Eco-extraction, étude phytochimique et activités biologiques : application aux composés phénoliques de la fleur de figuier de barbarie marocain (*Opuntia ficus-barbarica*).

Présentée par :

**Mariam MINHAJ**

Soutenu le : 17 Février 2021

A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat devant le jury composé de :

Pr. Bouchaib BENCHARKI	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Président
Pr. Badiia LYOUSSI	Faculté des Sciences, Fès	Rapporteur
Pr. Mohammed RHAZI	Ecole Normale Supérieure, Marrakech	Rapporteur
Pr. Said HILALI	Faculté des sciences et Techniques, Settat	Rapporteur
Pr. Abdeljalil ZOUHRI	Faculté des sciences et Techniques, Settat	Examineur
Pr. Moha TAOURIRTE	Faculté des sciences et Techniques, Marrakech	Co-Directeur de thèse
Pr. Lahboub BOUYAZZA	Faculté des sciences et Techniques, Settat	Directeur de thèse

### Résumé

**Eco-extraction, étude phytochimique et activités biologiques : application aux composés phénoliques de la fleur de figuier de barbarie marocain (*Opuntia ficus-barbarica*).**

La richesse moléculaire des produits de terroir marocain constitue une source importante de molécules bioactives d'origine naturelle. La mise en évidence de ces molécules nécessite de nombreuses étapes souvent longues et coûteuses. L'objectif de ce travail de thèse consiste à développer des méthodologies d'extractions innovantes, de fractionnement et d'identification de produits naturels d'origine végétale. Pour cela nous avons utilisé comme modèle végétal la fleur de figue de barbarie (*Opuntia ficus-barbarica*) qui est connu pour sa richesse phytochimique et son potentiel thérapeutique. Ce travail a d'abord produit au développement de deux méthodes d'extractions vertes : l'extraction hydroalcoolique assistée par ultrason (UAHE) et l'extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE). Ces techniques d'extractions ont été optimisées par un plan d'expérience, afin d'obtenir un extrait hydroalcoolique par UAHE, basée sur l'action des bulles de cavitation générées lors de la production des ondes ultrasonores, et un extrait aqueux par MAAE, basée sur l'utilisation combinée de la pression, de la température et des microondes. Les extraits obtenus par les méthodes conventionnelles ont également été étudiés. Il a pu être démontré que les méthodologies UAHE et MAAE permettent d'extraire rapidement et efficacement des composés phénoliques tout en conservant un potentiel antioxydant important. Il a ainsi pu être identifié, par analyse HPLC-ESI-DAD-MS, 16 composés avec un taux plus élevé d'isorhamnétine-3-O-rutinoside dans les extraits UAHE et MAAE. Enfin une partie de ce travail a démontré le potentiel antioxydant et antimicrobien de différentes fractions de UAHE et MAAE, qui a été corrélé à la présence des flavonoïdes. Ces résultats confirment la forte efficacité du procédé d'UAHE et MAAE pour la préparation d'antioxydants naturels à partir de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*. En tant que technologie efficace et respectueuse de l'environnement, les deux techniques d'extractions UAHE et MAAE sont fortement recommandées dans l'industrie verte pour la préparation de produits naturels.

**Mots clés :** Fleur ; Extraction ; *Opuntia ficus-barbarica* ; ultrason ; microonde ; Antioxydant ; isoraméthine ; Flavonoïdes ; Méthodologie de surface de réponse (RSM).

### ملخص

الاستخراج البيئي، دراسة الكيمياء النباتية، والأنشطة البيولوجية للمركبات الفينولية لزهرة التين الشوكي

*Opuntia ficus-barbarica* المزروع في المغرب.

يشكل الثراء الجزيئي للمنتجات المحلية المغربية مصدرا هاما للجزيئات النشطة بيولوجيا ذات الأصل الطبيعي. يتطلب اكتشاف هذه الجزيئات العديد من الخطوات التي غالبا ما تكون طويلة ومكلفة. لذلك يتمثل الهدف من هذه الأطروحة في تطوير منهجيات مبتكرة للاستخراج والتجزئة وتحديد المنتجات الطبيعية ذات الأصل النباتي. لهذا الغرض، استخدمنا زهرة التين الشوكي (*Opuntia ficus-barbarica*) كنموذج نباتي معروف بثرائه الكيميائي النباتي وإمكاناته العلاجية. أدى هذا العمل أولاً إلى تطوير طريقتين للاستخراج تحترم البيئة: الاستخراج المائي كحولي بمساعدة الموجات فوق الصوتية (UAHE) والاستخلاص المائي بمساعدة فرن الميكروويف (MAAE). تم تحسين تقنيات الاستخراج هذه من خلال تصميم تجريبي للحصول على مستخلص مائي بواسطة UAHE، بناءً على عمل فقاعات التجويف المتولدة أثناء إنتاج الموجات فوق الصوتية، ومستخلص مائي بواسطة MAAE على أساس الاستخدام المشترك للضغط ودرجة الحرارة والميكروويف. لقد ثبت أن هذه المنهجيات تسمح بالاستخراج السريع والفعال للمركبات الفينولية مع الاحتفاظ بإمكانيات كبيرة لمضادة للأكسدة. وبالتالي كان من الممكن تحديد، من خلال تحليل HPLC-ESI-DAD-MS، 16 مركباً بمعدل أعلى من isorhamnetin-3-O-rutinoside في مستخلصات UAHE وMAAE. كما تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات التي تم الحصول عليها بالطرق التقليدية. أخيراً، أظهر الجزء الأخير من هذا العمل إمكانات مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات لأجزاء مختلفة من UAHE وMAAE، والتي ارتبطت بوجود مركبات الفلافونويد. تؤكد هذه النتائج الكفاءة العالية لعملية UAHE وMAAE لتحضير مضادات الأكسدة الطبيعية من أزهار *Opuntia ficus-barbarica*. باعتبارها تقنية فعالة وصديقة للبيئة، يوصى بشدة باستخدام UAHE وMAAE في الصناعة الخضراء لتحضير المنتجات الطبيعية.

الكلمات المفتاحية: زهرة؛ فلافونويد؛ مضادات الأكسدة؛ *Opuntia ficus-barbarica*؛ منهجية سطح الاستجابة (RSM)

N° d'ordre ...

## CENTRE DES ETUDES DOCTORALES SETTAT

### Thèse

Présentée par : MINHAIJ Mariam

En vue de l'obtention du diplôme **Doctorat National**

### Formation Doctorale :

Chimie Appliquée et Environnement

### Spécialité :

Chimie des Substances Naturelles

### Thème :

**Eco-extraction, étude phytochimique et activités biologiques : application aux composés phénoliques de la fleur de figuier de barbarie marocain (*Opuntia ficus-barbarica*).**

Soutenu le 17 Février 2021

Devant le jury

<b>Pr. BENCHARKI Bouchaib</b>	FST Settat	<b>Président</b>
<b>Pr. LYOUSSI Badiia</b>	FS Fès	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. RHAZI Mohammed</b>	ENS-Marrakech	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. HILALI Said</b>	FST Settat	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. ZOUHRI Abdeljalil</b>	FST Settat	<b>Examineur</b>
<b>Pr. TAOURIRTE Moha</b>	FST Marrakech	<b>Co-directeur de thèse</b>
<b>Pr. BOUYAZZA Lahboub</b>	FST Settat	<b>Directeur de thèse</b>

## Remerciements

---

*Avant tout, je tiens à exprimer mes vifs remerciements éternels non seulement par nécessité, mais par respect et gratitude profonde à mon père spirituel le Docteur SIDI JAMAL QUADIRI BOUDCHICH, de mon idole le Docteur SIDI MOUNIR QUADIRI BOUDCHICH, pour leurs formes soutiens inconditionnels, pour les opportunités qui m'ont offert pour la réussite de cette thèse notamment en m'invitant aux différentes activités de la Fondation Al-Mouftaqa (toutes mes remerciements à l'équipe des ASSISES MUSULMANES DE L'ÉCOLOGIE), Et surtout pour leurs vaillance continue et sans cesse afin de m'assurer un équilibre spirituel qui me permet de devenir un contributeur au capital immatériel de mon cher pays LE MAROC, et un membre actif de ma société et environnement.*

*Le présent travail n'aurait pas pu avoir lieu sans la contribution de nombreuses personnes. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude en remerciant tous ceux qui m'ont aidée pour mener à bien ce travail.*

*Mes profondes gratitudes vont d'abord à Monsieur le Professeur Bouchaib BENCHARKI, Directeur de notre centre d'école doctorale au sein de l'université Hassan 1<sup>er</sup>, pour l'immense intérêt et les efforts qu'il déploie pour l'épanouissement de la recherche scientifique au sein de notre établissement. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse malgré ses multiples obligations. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mon profond respect.*

*J'adresse mes sincères remerciements aux Directeurs de ma thèse, Professeur Lahboub BOUYAZZA et Professeur Moha TAOURIRTE, qui m'ont permis de relever le défi de la collaboration du doctorat entre l'Université Hassan 1<sup>er</sup> et l'Université Cadi Ayyad en réalisant et achevant ce travail dans de bonnes conditions.*

*J'exprime mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur Moha TAOURIRTE, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech et Responsable de Laboratoire de Recherche en Développement Durable et Santé, pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe de recherche. Sous sa direction, j'ai grandement appris et acquis une solide expertise dans le domaine de la chimie et biologie des substances naturelles. Je lui suis également très reconnaissante de m'avoir laissé autant de liberté et de responsabilités au sein de son laboratoire.*

*Monsieur le Professeur Ahmed BELFKIRA, Merci infiniment pour votre grande disponibilité, pour votre soutien et pour vos nombreux conseils.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Madame le Professeur Badiaa LYOUSSE de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en qualité de rapporteur.*

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur **Mohammed RHAZI**, Professeur à l'École Normale Supérieure, Université Cadi Ayyad de Marrakech ainsi qu'à Monsieur **Saïd HILALI**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1<sup>er</sup> de Settat qui ont fait l'honneur d'examiner ce travail en qualité de rapporteurs. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute considération.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur **Abdeljalil ZOUHRI**, Professeur au laboratoire de Chimie Appliquée et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques de Settat, qui a toujours manifesté une grande disponibilité pour me faire bénéficier de ses connaissances ainsi que pour sa participation au jury de cette thèse.

Mes remerciements vont à Monsieur le Professeur **Abdelkader Outzourhit**, directeur du Centre d'Analyses et Caractérisation à l'Université Cadi Ayyad de Marrakech, d'avoir accepté ma demande pour effectuer mon stage de recherche au sein du laboratoire de techniques d'analyses

J'adresse également mes remerciements à Madame **Majdouline Belaqziz**, Responsable Technique au laboratoire HPLC-MS du Centre d'Analyses et Caractérisation à l'Université Cadi Ayyad, Marrakech. Merci pour l'énorme contribution que vous m'avez apportée afin de mener à bien ce projet. Soyez assurée de mon profond respect et de ma vive reconnaissance.

Mes vifs remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur **Mohammed Mansori**, Directeur du laboratoire IMED à la Faculté des Sciences et Technique de l'Université Cadi Ayyad, Marrakech, d'avoir accepté ma demande de stage au sein de son laboratoire.

Mes sincères et profonds remerciements vont au Professeur **Abderrahman CHAIT**, département de biologie, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, pour avoir contribué à l'évaluation pharmacologique des extraits de la plante. Aussi j'adresse mes remerciements chaleureux à M. **Abderrazak REGRAÛI** qui répond toujours à toute demande des animaux et pour son aide précieuse.

Mes vifs remerciements s'adressent à Monsieur **Ahmed OUHAMMOU**, professeur botaniste, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, pour son aide dans la collecte et l'identification de l'espèce végétale étudiée dans ce travail.

Un très grand merci à toutes **les coopératives** et à **l'équipe de la start-up M4Nature** qui ont accepté de participer à ce travail.

Mes vifs remerciements vont à tous les professeurs et le personnel du Laboratoire de Développement Durable et Santé et le laboratoire IMED de la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech, notamment le Professeur **Rachid JALAL**, le Professeur **Hafida BOUMAMA**, le Professeur **Rachid HAKOU**, le professeur **Mohamed LOUTO** et le Professeur **Mohamed AIT BABRAM** pour leurs conseils qui m'ont été d'une grande utilité pour la réalisation de mon travail.

Merci également à Madame le Professeur **Imane Elateri**, de la faculté des Sciences Semlalia de Marrakech, auprès de laquelle j'ai trouvé un soutien fort et inconditionnel pour mener à bien la partie

biochimie de ce travail. Je la remercie vivement pour sa confiance, ses conseils et de l'amitié dont elle m'a honoré. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Un vif merci à tous les amis, les collègues et les stagiaires que j'ai côtoyés à la Faculté des Sciences et Techniques de Settat, à la Faculté des Sciences Semlalia et à la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech particulièrement **Salma LATIQUE**, **Yusra El Jemli**, **El houssain Ablouh**, **Nadia HIDAR**, **Meriem RAFIA**, **Zineb ELGABASS**. Merci pour tous les innombrables moments forts que nous avons vécus ensemble. Sans votre serviabilité, vos encouragements et la bonne ambiance que vous créaient, mes années de thèse auraient eu une toute autre saveur.

Je ne saurais oublier mon mari **Mohamed KRABTI** qui n'a cessé d'être pour moi un exemple de persévérance, de courage et de générosité. Merci pour m'avoir aidé à surmonter les difficultés quotidiennes de la vie d'un chercheur. Je me permets aujourd'hui de te présenter ma profonde reconnaissance.

Le plus ENORME, merci s'adresse à ma famille qui m'a toujours aidée et soutenue dans mes choix, et qui ont été présents chaque fois que cela été nécessaire. Merci **Maman**, Merci **Papa**, Merci ma Sœur **Hakima**, Merci ma Sœur **Nadia**, Merci ma Sœur **Amina**, Merci ma Sœur **Nouhaila**, Merci mes oncles **Abdelmjid**, **Boujamaa**, **Abdarrahim**, **Hassan** et **Mouhamed**, Merci mon beau-père **Si Abdeljalil**. C'est avec vous que j'ai partagé mes joies, mes peines, vous m'avez soutenue grâce à votre présence, à votre sourire, à votre amitié. Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde reconnaissance pour toute la patience et les sacrifices que vous avez consentis pour moi et dont je vous serais à jamais redevable. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

## Fiche présentative de la thèse

---

- **Doctorante** : Mariam MINHAJ
- **Formation Doctorale** : Chimie Appliquée et Environnement
- **Spécialité** : Chimie des Substances Naturelles
  
- **Intitulé du travail** : Eco-extraction, étude phytochimique et activités biologiques : application aux composés phénoliques de la fleur de figuier de barbarie marocain (*Opuntia ficus-barbarica*)
  
- **Directeur de thèse** : Pr. Lahboub BOUYAZZA  
Établissement : Faculté des Sciences et Techniques Settat, Université Hassan 1<sup>er</sup>.
- **Co-Directeur de thèse** : Pr. Moha TAOURIRTE  
Établissement : Faculté des Sciences et Techniques Marrakech, Université Cadi Ayyad.
  
- **Lieux de réalisation des travaux** :
  - Laboratoire de Chimie Appliquée et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1<sup>er</sup>, Settat, Maroc.
  - Laboratoire de Recherche en Développement Durable et Santé, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.
  - Centre d'Analyse et de Caractérisation, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.
  - Laboratoire de pharmacologie à la Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.
  
- **Période de réalisation du travail de thèse** : Décembre 2015 - Décembre 2020

## Principales publications et communications en rapport avec le sujet

---

- **Publications**

**Mariam Minhaj**, Yousra El Jemli, Moha Taourirte, Lahboub Bouyazza, (2019), Preliminary phytochemical screening, total phenolic, flavonoids and polysaccharides contents and antioxidant capacity of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Opuntia ficus-barbarica* flowers, J. Mater. Environ. Sci., 2019, Volume 10, Issue 12, Page 1369-1381.

- **Communications dans des congrès internationaux**

**Mariam Minhaj**, Moha Taourirte, Lahboub Bouyazza, « Preliminary phytochemical screening, total phenolic, flavonoids and polysaccharides contents and antioxidant capacity of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Opuntia ficus-indica* », VIII<sup>ème</sup> Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bioressources, Mars 2020, Tunisie.

**Mariam Minhaj**, Yousra El Jemli, Moha Taourirte et Lahboub Bouyazza « Chemical composition and antioxidant capacity of *Opuntia ficus-indica* flowers extracts obtained by infusion, decoction and hydroalcoholic methods : A comparison study », 6<sup>ème</sup> Edition de l'école Internationale de recherche : « Biodiversité des PAM, Biotechnologies, Produits de terroir et Valorisation des Substances Naturelles », 19-21 Avril 2018, Faculté des Sciences Agadir, Maroc.

**Mariam Minhaj**, Moha Taourirte et Lahboub Bouyazza, « Valorisation de cactus pour le service communautaire et participer au développement de l'innovation et production durable, préserver l'environnement et améliorer la nutrition humaine ». Première Conférence Arabe sur les Plantes Médicinales et Aromatiques : « Évaluation des plantes médicinales et aromatiques pour un développement durable », 18 et 19 Octobre 2017 à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès, Maroc.

**Mariam Minhaj**, Moha Taourirte et Lahboub Bouyazza, « Évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts de la fleur de figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*) », 6<sup>ème</sup> Symposium International sur les plantes Aromatiques et Médicinales SIPAM6, 16-18 Mars 2017, Marrakech, Maroc.

**Mariam Minhaj**, Moha Taourirte et Lahboub Bouyazza, « Évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits bruts de la fleur de figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*) » 5<sup>ème</sup> Congrès International de Biodiversité Végétale, 05 – 08 Octobre 2017, Marrakech, Maroc.

**Mariam Minhaj**, Moha Taourirte, Lahboub Bouyazza, « Contribution à l'étude chimique et biologique des extraits de figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*) » 1<sup>er</sup> Congrès International sur les Algues Cialgues-2016, Du 31 Mars au 02 Avril 2016, la Faculté des Sciences Semlalia Marrakech, Maroc.

**Mariam Minhaj**, Moha Taourirte, Lahboub Bouyazza, « Nutritional and Commercial Qualities of the cactus flowers (*Opuntia ficus indica*) produced in the Skhour Rhamna Region in Morocco », 1<sup>er</sup> Congrès International sur les Algues Cialgues-2016, Du 31 Mars au 02 Avril 2016, la Faculté des Sciences Semlalia Marrakech, Maroc.

### **Communications dans des congrès nationaux**

**Mariam Minhaj**, Moha Taourirte, Lahboub Bouyazza, « Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir d'*Opuntia ficus-indica* », 3<sup>ème</sup> Forum de la recherche Scientifique sous le thème : « De la recherche scientifique à l'innovation » Du 09 au 11 Mai 2018, la Faculté des Sciences Semlalia Marrakech, Maroc.

**Mariam Minhaj**, Moha Taourirte, Lahboub Bouyazza, « Qualité nutritionnelle et commerciale des fleurs du figuier de barbarie produit dans la région du Skhour Rhamna au Maroc », 2<sup>ème</sup> Forum de la Recherche Scientifique de la FSSM. « Recherche Scientifique au service du développement durable », Du 20 au 22 Octobre 2016, la Faculté des Sciences Semlalia Marrakech, Maroc.

**Mariam Minhaj**, Moha Taourirte, Lahboub Bouyazza, « Production et Valorisation des produits du terroir : Une opportunité pour le développement durable » à la 21<sup>ème</sup> édition de la semaine de l'étudiant 2016, l'Université Cadi Ayyad. Marrakech, Maroc.

**Mariam Minhaj**, Moha Taourirte, Lahboub Bouyazza, « Contribution à l'étude chimique et pharmacologique des extraits de la fleur de cactus (*Opuntia ficus indica*) », La journée d'étude scientifique sous le thème « Valorisation des produits de terroir : Locomotive de développement local », Le 15 Aout 2015, Association Ifni Initiative, Sidi Ifni, Maroc.



- **Prix**

1<sup>er</sup> Prix de la meilleure solution innovante au Concours étudiants COP22 j'agis pour le climat, « Eco-extraction et préparation d'extraits bioactifs de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* », Novembre 2016, Faculté des Sciences et Technique de Marrakech, Maroc.

3<sup>ème</sup> Prix ex-aequo Catégorie « jeunes chercheurs et doctorants » au concours national de l'innovation, 28 Novembre 2017, Association marocaine pour Recherche et Développement à Casablanca, Maroc.

1<sup>er</sup> Prix de la meilleure startup dans la catégorie de l'efficacité énergétique au Programme Cleantech Maroc 2018.

## Résumé

---

### **Eco-extraction, étude phytochimique et activités biologiques : application aux composés phénoliques de la fleur de figuier de barbarie marocain (*Opuntia ficus-barbarica*). Mariam MINHAJ**

La richesse moléculaire des produits de terroir marocain constitue une source importante de molécules bioactives d'origine naturelle. La mise en évidence de ces molécules nécessite de nombreuses étapes souvent longues et coûteuses. L'objectif de ce travail de thèse consiste à développer des méthodologies d'extractions innovantes, de fractionnement et d'identification de produits naturels d'origine végétale. Pour cela nous avons utilisé comme modèle végétal la fleur de figue de barbarie (*Opuntia ficus-barbarica*) qui est connu pour sa richesse phytochimique et son potentiel thérapeutique. Ce travail a d'abord conduit au développement de deux méthodes d'extractions vertes : l'extraction hydroalcoolique assistée par ultrason (UAHE) et l'extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE). Ces techniques d'extractions ont été optimisées par un plan d'expérience, afin d'obtenir un extrait hydroalcoolique par UAHE, basée sur l'action des bulles de cavitation générées lors de la production des ondes ultrasonores, et un extrait aqueux par MAAE, basée sur l'utilisation combinée de la pression, de la température et des microondes. Les extraits obtenus par les méthodes conventionnelles ont également été étudiés. Il a pu être démontré que les méthodologies UAHE et MAAE permettent d'extraire rapidement et efficacement des composés phénoliques tout en conservant un potentiel antioxydant important. Il a ainsi pu être identifié, par analyse HPLC-ESI-DAD-MS, 16 composés avec un taux plus élevé d'isorhamnétine-3-O-rutinoside dans les extraits UAHE et MAAE. Enfin une partie de ce travail a démontré le potentiel antioxydant et antimicrobien de différentes fractions de UAHE et MAAE, qui a été corrélé à la présence des flavonoïdes. Ces résultats confirment la forte efficacité du procédé d'UAHE et MAAE pour la préparation d'antioxydants naturels à partir de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*. En tant que technologie efficace et respectueuse de l'environnement, les deux techniques d'extractions UAHE et MAAE sont fortement recommandées dans l'industrie verte pour la préparation de produits naturels.

**Mots clés :** Fleur ; Extraction ; *Opuntia ficus-barbarica* ; ultrason ; microonde ; Antioxydant ; isoraméthine ; Flavonoïdes ; Méthodologie de surface de réponse (RSM).

### **Eco-extraction, phytochemical study and biological activities of phenolic compounds from the *Opuntia ficus-barbarica* flower cultivated in Morocco.**

**Mariam MINHAJ**

The molecular richness of Moroccan local products constitutes an important source of bioactive molecules of natural origin. The detection of these molecules requires many steps which are often long and expensive. The objective of this thesis work is to develop methodologies for innovative extraction, fractionation and identification of natural products of plant origin. For this we used as a plant model the prickly pear flower (*Opuntia ficus-barbarica*) which is known for its phytochemical richness and its therapeutic potential. This work first resulted in the development of two extraction methods: ultrasound-assisted hydroalcoholic extraction (UAHE) and microwave-assisted aqueous extraction (MAAE). These extraction techniques were optimized by an experimental design, in order to obtain a hydroalcoholic extract by UAHE, based on the action of the cavitation bubbles generated during the production of ultrasonic waves, and an aqueous extract by MAAE, based on the combined use of pressure, temperature and microwave. The extracts obtained by conventional methods were also studied. It has been shown that the UAHE and MAAE methodologies allow the rapid and efficient extraction of phenolic compounds while retaining significant antioxidant potential. It was thus possible to identify, by HPLC-ESI-DAD-MS analysis, 16 compounds with a higher rate of isorhamnetin-3-O-rutinoside in the UAHE and MAAE extracts. Finally, part of this work has demonstrated the antioxidant and antimicrobial potential of different fractions of UAHE and MAAE, which has been correlated with the presence of flavonoids. These results confirm the high efficiency of the UAHE and MAAE process for the preparation of natural antioxidants from *Opuntia ficus-barbarica* flowers. As an efficient and environmentally friendly technology, both UAHE and MAAE extraction techniques are highly recommended in the green industry for the preparation of natural products.

**Keywords:** Flower; Extraction; *Opuntia ficus-barbarica*; ultrasound; microwave; Antioxidant; isoramethine; Flavonoids; Response Surface Methodology (RSM).

الاستخراج البيئي، دراسة الكيمياء النباتية، والأنشطة البيولوجية للمركبات الفينولية لزهرة الصبار

### مريم منهاج *Opuntia ficus-barbarica* المزروعة في المغرب.

يشكل الثراء الجزيئي للمنتجات المحلية المغربية مصدرا هاما للجزيئات النشطة بيولوجيا ذات الأصل الطبيعي. يتطلب اكتشاف هذه الجزيئات العديد من الخطوات التي غالباً ما تكون طويلة ومكلفة. لذلك يتمثل الهدف من هذه الأطروحة في تطوير منهجيات مبتكرة للاستخراج والتجزئة وتحديد المنتجات الطبيعية ذات الأصل النباتي. لهذا الغرض، استخدمنا زهرة التين الشوكي (*Opuntia ficus-barbarica*) كنموذج نباتي معروف بثرائه الكيميائي النباتي وإمكانياته العلاجية. أدى هذا العمل أولاً إلى تطوير طريقتين للاستخراج تحترم البيئة: الاستخراج المائي كحولي بمساعدة الموجات فوق الصوتية (UAHE) والاستخلاص المائي بمساعدة فرن الميكروويف (MAAE).

تم تحسين تقنيات الاستخراج هذه من خلال تصميم تجريبي للحصول على مستخلص مائي بواسطة UAHE، بناءً على عمل فقاعات التجويف المتولدة أثناء إنتاج الموجات فوق الصوتية، ومستخلص مائي بواسطة MAAE على أساس الاستخدام المشترك للضغط ودرجة الحرارة والميكروويف.

لقد ثبت أن هذه المنهجيات تسمح بالاستخراج السريع والفعال للمركبات الفينولية مع الاحتفاظ بإمكانيات كبيرة مضادة للأكسدة. وبالتالي كان من الممكن تحديد، من خلال تحليل HPLC-ESI-DAD-MS، 16 مركباً بمعدل أعلى من isorhamnetin-3-O-rutinoside في مستخلصات UAHE وMAAE. كما تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات التي تم الحصول عليها بالطرق التقليدية.

الجزء الأخير من هذا العمل، أظهر إمكانات مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات لأجزاء مختلفة من مستخلصات UAHE وMAAE، والتي ارتبطت بوجود مركبات الفلافونويد. تؤكد هذه النتائج الكفاءة العالية لعملية UAHE وMAAE لتحضير مضادات الأكسدة الطبيعية من أزهار *Opuntia ficus-barbarica*. باعتبارها تقنية فعالة وصديقة للبيئة، يوصى بشدة استخدام UAHE وMAAE في الصناعة الخضراء لتحضير المنتجات الطبيعية.

#### الكلمات المفتاحية:

زهرة؛ فلافونويد؛ مضادات الأكسدة؛ *Opuntia ficus-barbarica*؛ الموجات فوق الصوتية؛ الميكروويف؛ منهجية سطح الاستجابة (RSM)

## Sommaire

---

Remerciements .....	1
Fiche présentative de la thèse .....	4
Principales publications et communications en rapport avec le sujet .....	5
Résumé .....	8
Abstract .....	9
ملخص .....	10
Liste des figures .....	15
Liste des tableaux .....	18
Liste des abréviations .....	20
Introduction .....	21
Chapitre I. Etude bibliographique .....	24
I.1. Généralités sur le figuier de barbarie .....	24
I.1.1. Taxonomie .....	24
I.1.2. Biologie du figuier de barbarie .....	24
I.1.3. La culture du figuier de barbarie au Maroc .....	26
I.2. Caractère particulier de la fleur de figuier de barbarie ( <i>Opuntia ficus-barbarica</i> ) .....	27
I.2.1. Morphologie de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	27
I.2.2. Utilisation traditionnelle et propriétés thérapeutiques .....	28
I.2.3. Etudes biologiques de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	28
I.3. Les antioxydants phénoliques naturels .....	31
I.3.1. Vue d'ensemble sur les polyphénols .....	31
I.3.2. Antioxydants phénoliques et radicaux libres .....	38
I.4. Méthodes d'extraction vertes « Eco-Extraction » pour les polyphénols des matrices végétales .....	41
I.4.1. L'extraction assistée par ultrasons (UAE, Ultrasonic Assisted Extraction) .....	42
I.4.2. L'extraction assistée par microondes (MAE, Microwave Assisted Extraction) .....	45
I.5. Extraction solide- liquide .....	49
I.5.1. Principes et mécanismes de l'extraction solide-liquide .....	50
I.5.2. Paramètres influençant l'extraction solide-liquide .....	50
I.6. Objectif de projet : La valorisation des produits de terroir au Maroc par ses substances naturelles .....	53
Chapitre II. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	54
II.1. Matériel végétal : .....	54
II.1.1. Situation du lieu de récolte et conduite technique .....	54
II.1.2. Classification taxonomique .....	54
II.2. Caractérisation physico-chimique de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	54
II.2.1. Teneur en eau : Humidité .....	54
II.2.2. Teneur en cendres .....	55
II.2.3. pH (Potentiel d'hydrogène) .....	55

II.2.4. Activité d'eau .....	55
II.2.5. Propriétés fonctionnelles .....	55
II.2.6. Teneur en matière grasse .....	56
II.2.7. Teneur en sucres totaux .....	56
II.2.8. Teneur en protéines .....	56
II.2.9. Teneur en fibres brutes .....	57
II.2.10. Couleur .....	57
II.2.11. Teneur en substances extractibles par l'eau .....	57
II.2.12. Teneur en substances extractibles par l'éthanol .....	58
II.3. Extractions conventionnelles .....	58
II.3.1. Extraction solide-liquide aqueuse par infusion et décoction .....	58
II.3.2. Extraction solide-liquide par macération .....	59
II.4. Extractions innovantes .....	60
II.4.1. Extraction hydroéthanolique assistée par ultrasons (UAHE, Ultrasonic Assisted hydroethanolic Extraction) .....	60
II.4.2. Extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE, Microwave Assisted aqueous Extraction) .....	64
II.5. Analyses des extraits .....	68
II.5.1. Rendement .....	68
II.5.2. Détermination de la teneur en polyphénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content) .....	68
II.5.3. Détermination de la teneur en flavonoïdes (TFC, Total Flavonoid Content) .....	69
II.5.4. Estimation de la teneur en polysaccharides .....	69
II.5.5. Détermination de l'activité antioxydante par des tests chimiques <i>in vitro</i> .....	69
II.6. Identification et quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes dans les extraits actifs de la fleur d' <i>Opuntia ficus barbarica</i> .....	72
II.6.1. Présentation des techniques utilisées : HPLC-UV et HPLC-MS/MS .....	72
II.6.2. Identification et quantification des molécules présentes dans l'extrait UAHE .....	74
II.6.3. Quantification des flavonoïdes présents dans les extraits et fractions .....	76
II.7. Investigation photochimique et biologique de différents extraits de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> par les méthodes statistiques descriptives .....	78
II.7.1. Analyse en Composante Principale (ACP) .....	78
II.7.2. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) .....	79
II.8. Bioactivité et investigation phytochimique des extraits UAHE et MAAE de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	79
II.8.1. Fractionnement des extraits bruts UAHE et MAAE par Extraction Liquide-Liquide (ELL) .....	79
II.8.2. Activité antimicrobienne .....	80
II.8.3. Activité antioxydante .....	82
II.8.4. Caractérisation phytochimique par HPLC : Identification des molécules présentes dans les fractions (F1-F3) des extraits UAHE et MAAE et détermination de la teneur en flavonoïdes .....	82
II.8.5. Détermination de la teneur en composés phénoliques .....	82
II.8.6. Détermination de la teneur en flavonoïdes .....	82

II.9. Traitement statistique des données .....	83
Chapitre III. Résultats et discussions .....	84
III.1. Caractérisation physico-chimique de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	84
III.1.1. Le taux d'humidité.....	85
III.1.2. Teneur en cendres .....	85
III.1.3. pH.....	86
III.1.4. Activité d'eau.....	86
III.1.5. Propriétés fonctionnelles.....	86
III.1.6. Teneur en matière grasse .....	87
III.1.7. Teneur en sucres totaux .....	87
III.1.8. Teneur en protéines.....	88
III.1.9. Fibres.....	88
III.1.10. Couleur.....	89
III.1.11. Teneur en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol.....	89
III.2. Extractions conventionnelles .....	89
III.2.1. Rendement des extractions .....	89
III.2.2. Résultats de criblage phytochimique .....	91
III.2.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	91
III.2.4. Estimation de la teneur en polysaccharides .....	92
III.2.5. Résultat de l'activité antioxydantes .....	93
III.2.6. Comparaison entre les méthodes d'extraction conventionnelles.....	98
III.3. Extraction hydro-éthanolique assistée par ultrasons (UAHE).....	100
III.3.1. Effet des conditions d'extraction sur la teneur totale en phénols .....	100
III.3.2. Effet des conditions d'extraction sur la teneur totale en flavonoïdes .....	103
III.3.3. Effet des conditions d'extraction sur la capacité antioxydante.....	104
III.3.4. Vérification des conditions optimales prédictives .....	107
III.3.5. Identification des molécules active de l'extrait optimisé UAHE par LC-DAD-ESI-MS .....	109
III.4. Extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE, Microwave-assisted aqueous extraction).....	117
III.4.1. Effet des conditions d'extraction sur le rendement de l'extrait MAAE d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	117
III.4.2. Effet des conditions d'extraction sur la teneur totale en phénols .....	120
III.4.3. Effet des conditions d'extraction sur la teneur en flavonoïdes par HPLC.....	122
III.4.4. Vérification des conditions optimales prédictives .....	123
III.4.5. Evaluation de la dégradation potentielle des molécules .....	125
III.5. Interprétation des résultats obtenus par les méthodes statistiques descriptives pour différents extraits de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	130
III.5.1. Distinction entre les méthodes d'extraction.....	130
III.6. Bioactivité et investigation phytochimique des extraits UAHE et MAAE de la fleur <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	134
III.6.1. Rendement des fractions de l'extraction liquide-liquide (ELL) des extraits bruts UAHE et MAAE.....	134
III.6.2. Activité antimicrobienne.....	134

III.6.3. Activité antioxydante .....	136
III.6.4. Caractérisation phytochimique par HPLC : .....	138
III.6.5. Détermination de la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes.....	143
III.6.6. Corrélation entre les activités biologiques et l'étude photochimique .....	145
Chapitre IV. Applications.....	147
IV.1. Application de l'extrait de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	147
IV.1.1. Potentiel d'application de l'extrait MAAE en agroalimentaire .....	147
IV.1.2. Potentiel d'application de l'extrait UAHE en cosmétiques .....	147
IV.2. Évaluation de la toxicité aigüe des extraits UAHE et MAAE de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	148
IV.2.1. Matériel et méthodes.....	148
IV.2.2. Résultats et discussion .....	150
Conclusion.....	151
Références bibliographiques .....	155



## Liste des figures

---

Figure I-1 : Le figuier de barbarie : a) la plante, b) Cladodes, c) Fleur, d) Fruit. ....	25
Figure I-2 : Schéma d'une fleur de figuier de barbarie ( <i>Opuntia ficus-barbarica</i> ) .....	27
Figure I-3 : Photos de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> (A) : vue de côté ; (B) : coupe longitudinale de la fleur.....	27
Figure I-4 : Structure de base des flavonoïdes. ....	32
Figure I-5 : Structure du (A) glycoside flavonoïde et (B) du flavonoïde aglycone. ....	32
Figure I-6 : Structures chimiques de flavonols .....	33
Figure I-7 : Structures chimiques de flavanones .....	33
Figure I-8 : Structures chimiques de flavan-3-ols .....	34
Figure I-9 : Structures chimiques de deux anthocyanes.....	34
Figure I-10 : L'origine biosynthétique du squelette flavonique .....	35
Figure I-11 : Biosynthèse des flavonoïdes. ....	35
Figure I-12 : Structure de dérivés de l'acide p-hydroxycinnamique.....	37
Figure I-13 : Structures chimiques de resvératrol .....	37
Figure I-14 : Systèmes à ultrasons (A : bain à ultrasons, B : sonde à ultrasons) .....	44
Figure I-15 : Représentation schématique de fonctionnement et mécanisme du système d'extraction assistée par microondes (MAE). a) Système FMAE (ouvert). b) Système PMAE (fermé) sous des conditions d'irradiations microondes respectivement monomode (A) et multimode (B) [82].....	47
Figure II-1 : Illustration schématique de la procédure d'extraction UAHE dans cette étude. .	61
Figure II-2 : Illustration schématique de la procédure d'extraction MAAE développé pendant cette étude.....	65
Figure II-3 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH <sup>•</sup> entre l'espèce radicalaire DPPH <sup>•</sup> .....	70
Figure II-4 : Courbe d'étalonnage de la quercétine-3-O-rutinoside.....	77
Figure II-5 : Schéma de fractionnement ELL adopté pour le partage en trois fractions (F <sub>H</sub> , F <sub>AE</sub> et F <sub>AQ</sub> ) de l'extrait brut UAHE et MAAE.....	80
Figure III-1 : Teneur en humidité des fleurs sèches de figuier de barbarie d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> . Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais .....	85
Figure III-2 : Rendements des différents extraits aqueux et hydroalcoliques de fleurs sèches de figuier de barbarie ( <i>Opuntia ficus-barbarica</i> ). Différentes lettres indiquent des différences statistiques selon le test post-hoc de Tukey (P <0,05). Chaque valeur est exprimée en moyenne ± écart type (n = 6 × 2). ....	90

Figure III-3 : Teneur en polysaccharides des extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> . ...	93
Figure III-4 : Activité de piégeage des radicaux DPPH d'extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> préparés par diverses méthodes à différentes concentrations. Les valeurs sont la moyenne $\pm$ écart type (n = 3). .....	95
Figure III-5 : Activité d'inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène des extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> préparés par diverses méthodes à différentes concentrations. Les valeurs sont la moyenne $\pm$ écart type (n = 3). .....	96
Figure III-6 : Pouvoir réducteur d'extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> préparés par diverses méthodes à différentes concentrations. ....	97
Figure III-7 : Surfaces de réponse de variables indépendantes sur la teneur totale en phénols (A-C) et la teneur totale en flavonoïdes (D-F) des extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> préparés par UAHE en utilisant un rapport constant de solvant sur solide ( $X_1$ ) à 60 mL/g (A et D) ; en utilisant une concentration constante d'éthanol ( $X_2$ ) à 50% (B et E) ; et en utilisant un temps constant ( $X_3$ ) pendant 30 min (C et F).....	102
Figure III-8 : Surfaces de réponse de variables indépendantes sur l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH (A-C) et le pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP (D-F) de l'extrait de fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> par UAHE en utilisant un rapport constant de solvant sur solide ( $X_1$ ) à 60 mL/g (A et D) ; en utilisant une concentration constante d'éthanol ( $X_2$ ) à 50% (B et E) ; et en utilisant un temps constant ( $X_3$ ) à 30 min (C et F). ....	107
Figure III-9 : Diagramme 2D des effets des paramètres d'extraction UAHE sur TPC, TFC, DPPH et FRAP.....	109
Figure III-10 : Chromatogrammes de l'extrait UAHE obtenus par HPLC-DAD/ EIS-MS, (A) : MS en mode ion négatif, (B) : UV à 280 nm, (C) : UV à 320nm, (D) : UV à 260 nm et (E) : UV à 370 nm. ....	110
Figure III-11 : Spectres d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion $[M-H]^-$ des composés 6-11. ....	112
Figure III-12 : Spectres d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion $[M-H]^-$ des composés 12-16.....	113
Figure III-13 : Structures chimiques des glycosides de flavonol identifiés dans l'extrait UAHE des fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> . ....	114
Figure III-14 : Surfaces de réponse de variables indépendantes d'extrait de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> sur le pourcentage de rendement (R) par MAAE en utilisant un rapport liquide solide constant à 35 mL/g (A), en utilisant une puissance microonde constante au niveau de 450W (B) et en utilisant un nombre de cycles constant de 3 cycles (C).....	120
Figure III-15 : Surfaces de réponse de variables indépendantes sur le contenu phénolique total (TPC) en mg AGE/g d'extrait de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> par MAAE en utilisant un rapport liquide solide constant à 35 mL/g (A), en utilisant une puissance microonde constante au niveau de 450W (B) et en utilisant un nombre de cycles constant de 3 cycles(C).....	121

Figure III-16 : Surfaces de réponse de variables indépendantes sur les flavonoides en mg/g d'extrait de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> par MAAE en utilisant un rapport liquide solide constant à 35 mL/g (A), en utilisant une puissance microonde constante au niveau de 450W (B) et en utilisant un nombre de cycles constant de 3 cycles(C).....	123
Figure III-17 : Diagramme 2D des effets des paramètres d'extraction MAAE sur R, TPC et Flavonoïdes. ....	124
Figure III-18 : Histogrammes comparatifs obtenus entre différentes techniques d'extraction pour le TPC (A), les flavonoides (B), le test DPPH (C) et le test FRAP (D).....	126
Figure III-19 : Chromatogrammes d'extraits de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> obtenus par MAAE, infusion à 40°C, décoction et macération.....	127
Figure III-20 : Pourcentage de recouvrement de quercétine-3-O-rutinoside avant (C0) et après les trois cycles d'irradiation microondes (C1-C3) .....	128
Figure III-21 : Analyse en composantes principales basée sur le moyen de dosage des composés phytochimiques, l'activité antioxydante (DPPH et FRAP) et le rendement obtenu sur différentes méthodes d'extractions. (A) graphique d'observation, (B) graphique des variables. ....	131
Figure III-22 : Dendrogramme de la CAH réalisée à partir des moyens de dosage des composés phytochimiques, l'activité antioxydante (DPPH et FRAP) et le rendement obtenu pour les différentes méthodes d'extractions.....	132
Figure III-23 : Activité antioxydante des extraits bruts et des fractions obtenus avec le test DPPH et le test FRAP. ....	138
Figure III-24 : Chromatogrammes d'extrait brut UAHE de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> obtenus par extraction hydroethanolique assistée par ultrason (85 mL/g, 80% d'éthanol et 32 min) et ses fractions d'hexane (orange), d'acétate d'éthyle (vert) et aqueux (violet).....	140
Figure III-25 : Chromatogrammes d'extrait brut de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> obtenus par extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE) (45 mL/g, 500W et 3 cycles d'extraction) et ses fractions d'hexane (orange), d'acétate d'éthyle (vert) et aqueux (violet). Colonne Acclaim Polar Advantage C18 (diamètre intérieur 4,6 ; longueur 250 mm ; 5 µm) ; gradient constitué d'eau ultra-pure acidifié (à 2,5% d'acide acétique) et de l'acétonitrile pure ; débit de 1 mL/min ; injection de 10 µl ; λ = 279 ; T = 25°C.....	141
Figure III-26 : Chromatogrammes des extraits bruts UAHE et MAAE de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> et ses fractions d'hexane (orange), d'acétate d'éthyle (vert) et aqueux (violet). Colonne Acclaim Polar Advantage C18 (diamètre intérieur 4,6 ; longueur 250 mm ; 5 µm) ; gradient constitué d'eau ultra-pure acidifié (à 2,5% par l'acide acétique) et de l'acétonitrile pure ; débit de 1 mL/min ; injection de 10 µl ; λ = 366 nm ; T = 25°C. ....	142
Figure III-27 : le contenu total en composés phénoliques (TPC) des extraits bruts (UAHE et MAAE) et des fractions obtenues à 5000 µg/mL.....	144
Figure III-28 : Quantification de la teneur en flavonoïdes par HPLC des extraits bruts (UAHE et MAAE) et des fractions obtenues à 5000 µg/mL.....	145

## Liste des tableaux

---

Tableau I-1 : Principaux flavonols-O-glycosylés détectés dans différents extraits de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> .....	29
Tableau II-1 : Matrice expérimentale du plan d'expériences en utilisant Box Behnken Design pour les trois facteurs étudiés : rapport liquide / solide (20: 1-100: 1 mL / g), éthanol-eau (0-100%) et temps d'extraction (15-45 min). .....	63
Tableau II-2 : Matrice expérimentale du plan d'expériences en utilisant Box Behnken Design pour les trois facteurs étudiés : rapport liquide/solide, puissance d'irradiation micro-ondes, et nombre de cycles.....	67
Tableau II-3 : Conditions du gradient d'analyse HPLC.....	75
Tableau II-4 : Liste des souches microbiennes testées.....	80
Tableau II-5 : Concentrations des extraits bruts (UAHE et MAAE) et ses fractions en µg/mL .....	81
Tableau III-1 : Paramètres physico-chimiques de la poudre des fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> . .....	84
Tableau III-2 : Polyphénols totaux et flavonoïdes d'extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> . .....	91
Tableau III-3 : Valeurs EC <sub>50</sub> des activités antioxydantes des extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> . .....	94
Tableau III-4 : Les données d'expérience pour TPC, TFC, DPPH et FRAP d'extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> préparés par l'UAHE en utilisant Box Behnken Design.....	100
Tableau III-5 : Estimation des coefficients de régression pour le modèle polynomial quadratique et l'analyse de la variance pour TPC, TFC, DPPH et FRAP de l'extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> préparés par l'UAHE. ....	101
Tableau III-6 : Données expérimentales de validation des valeurs prédites dans des conditions d'extraction optimales UAHE. ....	108
Tableau III-7 : Caractéristiques LC-ESI-MS des composés phénoliques identifiés dans l'extrait optimisé de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> . ....	116
Tableau III-8 : Les données d'expérience pour le rendement, la teneur totale en phénoliques et en flavonoïdes de l'extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> préparés par MAAE en utilisant Box Behnken Design.....	117
Tableau III-9 : Estimation des coefficients de régression pour le modèle polynomial quadratique et l'analyse de la variance pour le rendement, la teneur totale en phénoliques et en flavonoïdes de l'extraits de fleurs d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> préparés par MAAE.....	119
Tableau III-10 : Données expérimentales de validation des valeurs prédites dans des conditions d'extraction optimales de MAAE.....	124

Tableau III-11 : Matrice des corrélations entre les différentes variables obtenues avec le coefficient de corrélation de Pearson. ....	130
Tableau III-12 : Pourcentage massique (%) et couleur des fractions obtenues après le fractionnement ELL des extraits bruts UAHE et MAAE.....	134
Tableau III-13 : Effet des extraits bruts et ses fractions sur la croissance de quatre souches bactériennes exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.....	135
Tableau III-14 : Activité antioxydante ( $\mu\text{mol ET/g}$ extrait) des extraits brutes UAHE et MAAE, et des fractions obtenues avec les tests DPPH et FRAP.....	137
Tableau III-15 : la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits bruts UAHE et MAAE et de ses fractions.....	143
Tableau IV-1 : Évolution du poids corporel chez des souris traitées par les extraits aqueux (lot 2) et hydroalcoolique (lot 3) de la fleur d' <i>Opuntia ficus-barbarica</i> par voie orale à 3 g/kg.	150

## Liste des abréviations

---

ACP : Analyse en Composante Principale

ATCC : American Type Culture Collection

BBD : Box Behnken Design

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

DL 50 : Dose létale de 50 % des animaux d'expérience

DPPH : 2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle

EC<sub>50</sub> : Concentration efficace pour 50% d'activité antioxydante

ELL : Extraction Liquide-Liquide

F<sub>AE</sub> : Fraction acétate d'éthyle

F<sub>Aq</sub> : Fraction aqueuse

F<sub>H</sub> : Fraction hexane

FRAP : pouvoir antioxydant réducteur ferrique

HPLC-MS : chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse

MAE : Microwave Assisted Extraction

RSM : Response Surface Methodology

TFC : Contenu en Flavonoïdes Totaux (Total Flavonoid Content)

TPC : Contenu en Polyphénols Totaux (Total Phenolic Content)

UAE : Ultrasonic Assisted Extraction

## Introduction

---

Le contexte actuel pour la valorisation des produits du terroir marocain a permis l'ouverture de nouvelles voies de recherches prometteuses pour introduire ces produits dans les domaines des industries agroalimentaires. De tels produits sont source de composés ayant des applications dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

Aujourd'hui, les substances naturelles apparaissent comme des ingrédients d'intérêt pour remplacer les composés synthétiques qui sont en général nocifs pour la santé humaine. Le Maroc a connu par sa situation géographique stratégique, qui a eu une influence marquée sur le plan environnemental, ce qui a fait de ce pays un grand réservoir de ressources naturelles. Cette grande richesse en biodiversité reflétée par la multitude des écosystèmes écologiques, ont fait du Maroc une vitrine riche en produits de terroir dont plusieurs sont endémiques. Conscient de ce potentiel, le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts a réservé aux produits de terroir une place dans sa stratégie de développement agricole au programme « Plan Maroc Vert ». La préparation des ingrédients actifs à base de ces produits végétaux a permis la création des nouveaux projets et améliore la rentabilité de ces ressources. Les molécules actives d'origine naturelle, notamment celles possédant un pouvoir antioxydant puissant, représentent un potentiel économique énorme.

Pour qu'elles deviennent valorisées, les substances bioactives doivent être séparées de leur matrice végétale d'origine. L'extraction, de celles-ci, nécessite de nombreuses étapes souvent longues, coûteuses et posent de nombreux problèmes environnementaux. L'enjeu actuel consiste donc à développer de nouvelles méthodologies d'extraction efficace, rapide et respectueuse de l'environnement. Ainsi, pour la récupération de ces antioxydants naturels à partir des produits locaux, il est nécessaire de s'orienter vers des éco-procédés.

Les antioxydants naturels peuvent être extraits via différentes approches dans différentes conditions. La sélection de la méthode d'extraction joue un rôle essentiel et affecte fortement la nature et la quantité de composés phytochimiques extraits de plantes médicinales [1]. De plus, l'efficacité d'une méthode d'extraction est affectée par tous les paramètres du processus, par exemple la composition du solvant, le rapport solvant/solide, le temps et la température de l'extraction [2,3]. Les solvants de polarités différentes ont un effet significatif sur la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante. Récemment, des méthodes plus respectueuses de l'environnement ont été développées pour extraire les composés phénoliques

des matières végétales, notamment l'extraction assistée par fermentation, par enzyme, par ultrasons ou par micro-ondes [4]. Celles assistées par ultrasons et par microonde ont montré leur efficacité pour l'extraction des antioxydants naturels à partir de sources variées. Elles ressortent donc comme un procédé intéressant pour extraire les composés bioactifs.

L'intégralité des développements méthodologiques, effectués au cours de cette thèse, a été réalisée sur la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*. L'objectif de ce travail est de mettre au point une méthode d'extraction « dite verte » d'antioxydants à partir des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*. Elle s'est avéré être une plante « modèle » par sa richesse phytochimique en composés antioxydants. Cette fleur a aussi un potentiel nutritionnel et thérapeutique particulièrement intéressant à exploiter. Ce manuscrit, relatant le travail réalisé au cours de ces années écoulées, est subdivisé en quatre chapitres.

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique de l'*Opuntia ficus-barbarica*. Celle-ci est constituée d'une description botanique de la plante avec une présentation particulière sur sa fleur et une présentation détaillée des diverses molécules qu'elle contient. L'utilisation en médecine traditionnelle ainsi que les potentiels thérapeutiques de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* sont abordés. Après, nous avons rappelés quelques généralités sur les différentes techniques d'extraction employées à ce jour. Enfin, nous nous intéresserons aux systèmes de défenses antioxydantes exogènes. L'accent sera alors mis sur les antioxydants phénoliques notamment les flavonoïdes.

Le deuxième chapitre concerne les méthodes appliquées dans ce travail et le matériel utilisé dans les différentes études. En tout premier lieu, une étude a été menée sur la poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*. Puis, nous avons étudiés l'influence des paramètres de différentes méthodes d'extractions classiques sur le rendement phytochimique et la capacité antioxydante de différents extraits aqueux et hydroalcooliques de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*. Par la suite, nous avons réalisés une étude de l'optimisation de l'extraction hydroalcoolique assistée par ultrasons (UAHE) et une étude de l'optimisation de l'extraction aqueuse assistée par micro-onde (MAAE). Une partie est dédiée à l'analyse quantitative des antioxydants naturels des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* et à l'identification des molécules majoritaires de l'extrait UAHE par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultra-violet et à un spectromètre de masse (HPLC-UV-MS). Après la mise en évidence par des outils de statistique descriptive d'extraits plus actifs, la dernière partie est consacrée à l'étude des activités antioxydante et antibactérienne de deux extraits bruts (UAHE et MAAE) et ses fractions, ainsi qu'à leur caractérisation phytochimique par HPLC-UV-MS.



Le troisième chapitre du travail présente et discute les résultats obtenus lors de l'étude phytochimique de différents extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* et nous avons détaillés les étapes de différentes méthodes d'extraction conventionnelles, de l'optimisation de l'extraction hydroalcoolique assistée par ultrasons et de l'extraction aqueuse assistée par microonde, de fractionnement et de l'identification des composés phénoliques. Une présentation des résultats biologiques obtenus in vitro y a été également détaillée.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude de potentiel de l'utilisation de ces extraits dans le domaine de l'agroalimentaire et cosmétique, et à l'étude de la toxicité aigüe des extraits UAHE et MAAE de cette fleur sur un modèle animal. Le choix de l'étude de la toxicité est dicté par le fait de rechercher si cette plante présenterait un danger sur la santé des consommateurs.

Enfin les conclusions essentielles de l'ensemble de ce travail ainsi que les perspectives de sa continuité ont été apportées.

## Chapitre I. Etude bibliographique

---

### I.1. Généralités sur le figuier de barbarie

Le figuier de barbarie est une plante originaire des régions arides et semi-arides du Mexique, Elle a été introduite en Afrique du Nord vers le 16<sup>ème</sup> siècle en raison de ses fruits comestibles [5,6]. Au Maroc, elle porte le nom de « Zaâboul » et « Hindia ». Plantée pour la restauration des sols et pour la nutrition du bétail.

#### I.1.1. Taxonomie

Le figuier de barbarie appartient à la classe des *Dicotylédones*, de l'ordre des *Caryophyllacées* [7], famille des *Cactacées* du genre *Opuntia*. Il comprend environ 300 espèces réparties en quatre sous genres, dont trois sont largement présents au Maroc [8]:

- *Brasiliopuntia* : tronc non articulé, articles cylindriques et aplatis (une seule espèce au Maroc : *Opuntia brasiliensis*).
- *Cylindropuntia* : articles cylindriques portant des épines (4 espèces au Maroc).
- *Platyopuntia* : articles aplatis en raquettes, feuilles petites et caduques, épines non gainées (au moins 21 espèces au Maroc). L'*Opuntia ficus-barbarica*, plus connue sous le nom de figuier de barbarie, appartient au dernier sous genre de l'*Opuntia* [9].

Au Maroc, l'espèce commune est *Opuntia ficus-barbarica* A. Berger [9], plus connue sous le nom de figuier de barbarie, appartient au dernier sous genre de l'*Opuntia* [10,11]. Le nom *Opuntia ficus-indica* a la priorité sur d'autres noms donnés à cette espèce [12].

Synonymes :

- *Opuntia ficus-indica* var. *gymnocarpa* (F.A.C. Weber) Speg., Anales Mus. Nac. Buenos Aires ser. 3, 4 : 512. 1905.
- *Opuntia ficus-indica* var. *decumana* (Haw.) Speg., Anales Mus. Nac. Buenos Aires ser. 3, 4 : 512. 1905.
- *Opuntia ficus-barbarica* A. Berger. Monatsschr. Kakteenk. 22: 181. 1912.
- *Opuntia tuna-blan-ca* Speg. An. Soc. Cient. Arg. 99: 107. 1925.

#### I.1.2. Biologie du figuier de barbarie

Le figuier de barbarie (*Opuntia ficus-barbarica*) est bien adapté aux conditions de sécheresse. C'est une plante robuste qui peut mesurer jusqu'à 5 mètres de hauteur (Figure I-1

a), avec un tronc épais et ligneux. Ses articles aplatis en forme de raquettes (cladodes) (Figure I-1 b) de couleur vert mat, ayant une longueur de 30 à 50 cm et une largeur de 15 à 30 cm, sont couverts de petites aréoles, d'épines et de glochides blancs. Ses fleurs, marginales sur le sommet des cladodes, sont hermaphrodites, de couleur jaune et deviennent rougeâtres à l'approche de la sénescence de la plante (Figure I-1 c). Ses fruits sont des baies charnues ovoïdes ou piriformes pourvues d'épines (Figure I-1 d). Ils sont généralement verdâtres ou jaunes à maturité. La pulpe est de couleur jaune-orangé, rouge ou pourpre, parsemée de nombreuses petites graines [13].



**Figure I-1 : Le figuier de barbarie : a) la plante, b) Cladodes, c) Fleur, d) Fruit.**

Sur le plan physiologique, l'*Opuntia ficus-barbarica* a un métabolisme spécial, dit « métabolisme acide crassulacée » (CAM). Les plantes de ce type sont capables de fixer le CO<sub>2</sub> durant la nuit, et opèrent la photosynthèse durant la journée avec leurs stomates fermés, réduisant ainsi au minimum la perte d'eau. Cette caractéristique, jointe à la succulence des feuilles et des tiges et à la présence d'une cuticule épaisse, les rend bien adaptés à des conditions de sécheresse [14].

Traditionnellement, le figuier de Barbarie est multiplié végétativement par bouturage de raquettes. Les jeunes plantes peuvent entrer en floraison à partir de la 2<sup>ème</sup> ou de la 3<sup>ème</sup> année. La durée et la période du cycle annuel dépendent de la variété et de la zone géographique [6].

### **I.1.3. La culture du figuier de barbarie au Maroc**

Au Maroc, le figuier de barbarie a été introduit en 1770 et est aujourd'hui bien représenté dans le paysage rural marocain. Sa répartition géographique est assez vaste puisqu'on le trouve aussi bien dans les régions côtières depuis Sidi Ifni jusqu'à Tanger que dans les régions continentales. La région de Guelmim-Sidi Ifni représente plus de 50% (>50 000 ha) de la surface nationale, suivi par Haouz-El Kelaa des Sraghna avec 30% (environ 30 000 ha). Khouribga est en troisième position, Doukkala en quatrième [15]. Cette évolution de la surface de figuier de barbarie est le résultat de nombreuses opérations de plantation menées par des agriculteurs en collaboration avec des agences de développement et des organismes de conseil au sein de programmes nationaux de lutte contre l'érosion et de contrôle de la sécheresse [8]. Actuellement le ministre de l'agriculture marocaine dans le cadre de programme Plan Maroc Vert, encourage la plantation de figuier de barbarie comme culture alternative dans les régions aride et semi-aride. Chaque année, plus de 4 000 ha sont plantés dans les régions de centre et de sud du pays [16]. Ces dernières années, plusieurs entreprises et coopératives rurales ont été créées pour la valorisation de figue de barbarie par la fabrication des produits alimentaire comme la confiture, le vinaigre, la farine de nopal et l'huile de graines. Cependant l'intérêt principal réside dans son rôle de source de fourrage pour le bétail durant les fréquentes années sèches.

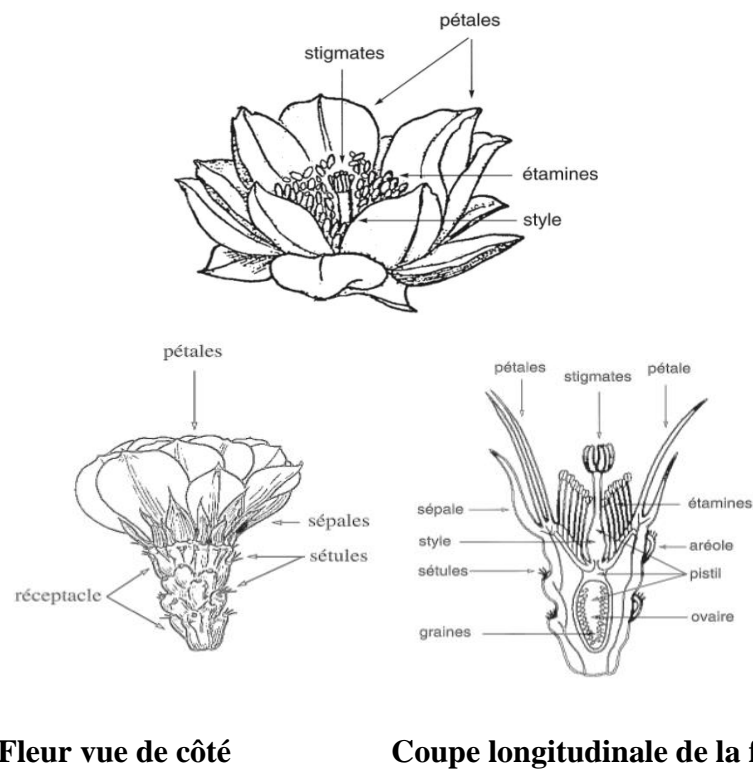
L'arrivée de la cochenille (*Dactylopius Opuntiae*) a provoqué une menace pour les cactus du Maroc et du bassin méditerranéen. L'origine de cette arrivée est difficile à prétendre, la cochenille est aujourd'hui observée à Youssoufia, Sidi Bennour, Rhamna, Kelaa Sraghna et maintenant Sidi Ifni. Cet insecte a le pouvoir de faire d'importants dégâts (proliférer, détruire les plantations) si on ne prend pas les mesures nécessaires. Des interventions d'urgence ont été menés par les autorités ont été menés : déracinant et incinérant toutes les plantations de cactus sur plus de 400 ha à Sidi Bennour dans la région de Doukkala [15]. Des mesures de contrôle ont été mises en place en collaboration avec le Centre International de Recherche Agricole dans les Zones Arides (ICARDA).

La plante de cactus est une culture économiquement importante avec de nombreuses utilisations. Elle est utilisée comme : (i) fourrage en raison de ses caractéristiques nutritionnelles [5] et (ii) ingrédient pour fabriquer des aliments [11] dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique [17] car il a été démontré qu'il possède des propriétés biologique comme anticancéreuses, antivirales et antidiabétiques [13]. De plus, le jus de cactus aurait une puissante activité antioxydante et riche en glucose et en fructose [18].

## I.2. Caractère particulier de la fleur de figuier de barbarie (*Opuntia ficus-barbarica*)

### I.2.1. Morphologie de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*

Les fleurs du figuier de barbarie sont sessiles hermaphrodites et actinomorphes. Elles se développent sur la partie supérieure des raquettes âgées de 1 à 2 années et rarement sur les plus âgées [15,19]. Les raquettes les plus productives sont celles qui sont plus exposées à la lumière, elles peuvent produire chacune plus de 20 bourgeons floraux. La fleur d'*Opuntia* possède des étamines abondantes arrangées en spirales et un style régulier (Figures I-2 et I-3). L'ovaire est infère et englouti dans un réceptacle épais. Les ovules sont connectés par un funicule bien développé, qui entoure toute l'ovule [15].



Fleur vue de côté

Coupe longitudinale de la fleur

Figure I-2 : Schéma d'une fleur de figuier de barbarie (*Opuntia ficus-barbarica*)



Figure I-3 : Photos de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* (A) : vue de côté ; (B) : coupe longitudinale de la fleur

On peut classifier les fleurs des différentes espèces d'*Opuntia* par leur période de floraison, la forme de la fleur, sa longueur, aussi par la couleur des pétales [19]. Les fleurs d'*Opuntia* sont de différentes couleurs, mais la progression des couleurs pendant la floraison commence du blanc au jaune au rouge ou orange [13]. L'apiculture dans la région de Tiznit dépend essentiellement de la culture du figuier de Barbarie. Avec un calendrier apicole qui dure 7 mois (Mars-Sept.), l'activité des abeilles a lieu sur les fleurs de l'*Opuntia ficus-barbarica* pendant 3 mois (avril-juin), ce qui permet de développer l'apiculture en parallèle. Les rendements des ruches sont de 1 à 4 litres de miel [8].

### **I.2.2. Utilisation traditionnelle et propriétés thérapeutiques**

La fleur de figuier de barbarie (*Opuntia ficus-barbarie*) est la partie de la plante la plus utilisée pour prévenir et traiter de nombreuses maladies. Elle est utilisée dans la pharmacopée traditionnelle pour soigner les troubles de l'appareil digestif, en particulier contre les maladies rénales, le diabète, Constipation et contre les douleurs abdominales, colites, irritations intestinales chroniques, diurétique et anti diarrhéique [16]. Les capsules des corolles, des fleurs séchées, sont utilisées comme remède du dysfonctionnement de la prostate (hypertrophie bénigne de la prostate) [20]. En Sicile, le thé préparé avec les fleurs de l'*Opuntia ficus-barbarica* est utilisé comme traitement contre les douleurs rénales [10].

### **I.2.3. Etudes biologiques de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica***

La plante d'*Opuntia ficus-barbarica*, très réputée pour ses fruits consommables (figue de Barbarie), possède d'excellentes propriétés thérapeutiques, prouvées par la médecine traditionnelle [13]. Ces fleurs, considérées comme l'un des sous-produits de l'industrie du cactus et rejetée après la séparation des fruits [21,22], présentent une source potentielle d'antioxydants naturels tels que les composés phénoliques (les flavonoïdes et les acides phénoliques). Selon de nombreuses données rapportées, la fleur possède un bon pouvoir antibactérien [23], cicatrisant [24], diurétique [25], anti-inflammatoire [26] et anti-ulcérogène [27].

Le tableau I-1 résume la composition et les pourcentages en flavonoïdes selon l'origine de la fleur d'*Opuntia* (Italie, en Tunisie et au Maroc). On peut noter la présence, dans les extraits méthanoliques et aqueux, d'une quantité importante de flavonoïdes dans ces fleurs. Ces derniers incluent les glycosides d'isorhamnetine comme (principaux composés phénoliques), suivis par les glycosides de quercétine et de kaempférol [21,22,26,28,29].

**Tableau I-1 : Principaux flavonols-O-glycosylés détectés dans différents extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica***

Flavonoïdes	% Phénoliques totaux identifiés	Origine de la fleur	Références
<b>Kaempferol-3-O-rutinoside</b>	4,89	Italie	[28]
	1,30	Tunisie	[22]
	4,66	Tunisie	[36]
	0,61	Tunisie	[26]
<b>Kaempferol 3-O-arabinoside</b>	3,96	Italie	[28]
	7,10	Tunisie	[22]
	1,23	Tunisie	[36]
	0,20	Tunisie	[26]
<b>Quercetin-3-O- rutinoside (Rutin)</b>	8,67	Italie	[28]
	10,50	Tunisie	[22]
	3,19	Maroc	[21]
	3,75	Tunisie	[36]
	36,68	Tunisie	[26]
<b>Quercetin 3-O-glucoside</b>	5,47	Italie	[28]
	6,00	Tunisie	[22]
	4,95	Tunisie	[36]
<b>Quercetin-3-O- galactoside (Hyperoside)</b>	30,57	Tunisie	[26]
	7,20	Tunisie	[22]
	2,53	Tunisie	[36]
<b>Quercetin-3-O-rhamonoside</b>	12,60	Tunisie	[26]
<b>Isorhamnetin 3-O-robinobioside</b>	52,22	Italie	[28]
<b>Isorhamnetin 3-O-galactoside</b>	11,98	Italie	[28]
	12,50	Tunisie	[22]
	1,87	Tunisie	[36]
<b>Isorhamnetin-3-O-rutinoside</b>	0,10	Tunisie	[26]
	34,70	Tunisie	[22]
	4,66	Tunisie	[36]
<b>Isorhamnetin 7-O-rutinoside</b>	47,72	Maroc	[21]
<b>Isorhamnetin 3-O-glucoside</b>	8,86	Italie	[28]
	2,52	Tunisie	[26]
	7,90	Tunisie	[22]
	2,06	Tunisie	[36]
<b>Isorhamnetin 3-O-rhamnosyl 7-O-rutinoside</b>	32,84	Maroc	[21]

Les principaux constituants volatiles des feuilles fraîches sont : la germacrène D (12,6%), le 1-hexanol (12,3%), le n-tétradécane (9,1%) et le decanal (8,2%) [28]. D'autres substances non-phénoliques tels que les sucres (fructose, glucose, saccharose et tréhalose), les  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocophérols, les acides organiques (acides oxalique, quinique, malique et citrique), les acides gras (acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés) et les hydroxycinnamoyls ont également été quantifiés presque à tous les stades de la floraison [30]. Cette fleur est également une bonne source de minéraux (Na, K, Ca, et Mg) [31,32] et

l'extrait de mucilage de la fleur contient une teneur élevée en polysaccharides ( $506,7 \pm 5,2\text{mg/g}$  d'extrait) [27].

Il a été démontré que la quantité totale de flavonoïdes et d'autres phénols dans les fleurs d'*Opuntia* varie en fonction du solvant d'extraction utilisé, du stade de développement de la fleur et des méthodes de traitement utilisées [29,33,34]. Les solvants polaires sont plus efficaces pour l'extraction des polyphénols à partir des fleurs d'*Opuntia ficus-indica* [21,29]. Selon Ammar et al. [29], l'extrait méthanolique ( $EC_{50} = 160\mu\text{g/mL}$ ) et les extraits aqueux ( $EC_{50} = 200\mu\text{g/mL}$ ) obtenus par Soxhlet ont montré une teneur élevée en composés phénoliques et la meilleure capacité antioxydante mesurée par leur capacité à réduire  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ . La méthode d'extraction Soxhlet a été plus efficace par rapport à la méthode d'extraction par macération. De même, Benayad et al. [21] ont démontré que la méthode de traitement écologique et économique de l'extraction accélérée par solvant (ASE, accelerated solvent extraction) permettait d'améliorer les rendements des flavonoïdes et des phénols que la méthode de macération pour les fleurs marocaines d'*Opuntia ficus-indica*.

La composition chimique d'extraits d'hexane des fleurs tunisiennes appartenant à deux espèces de figes de Barbarie, *Opuntia ficus-indica* et *Opuntia stricta* a été étudiée, par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse, pendant les quatre stades de développement de la fleur : végétative, floraison initiale, floraison complète et post-floraison. Cette étude a montré des variations significatives/remarquables dans les profils de composés d'extraits [23]. Certains des principaux composés étaient les alcools, les esters et les terpènes. Au stade post-floraison, la teneur en polyphénols a augmenté de manière significative pour atteindre la teneur la plus élevée (49 et 81 mg d'acide gallique/g d'extrait pour *Opuntia ficus-indica* et *Opuntia stricta* respectivement). Cela peut s'expliquer par les réarrangements des composés se produisant pendant le métabolisme de floraison conduisant à une diminution ou à une modification des structures des composés phénoliques. Ces résultats suggèrent que le stade post-floraison peut être caractérisé par la croissance maximale. En fait, on pourrait postuler que pendant la phase post-floraison, les fleurs accumulent des composés phénoliques pour se préparer au processus de lignification. En effet, de nombreuses études rapportent que la lignine est un polymère synthétisé à partir de composés phénoliques [35].

Cette étude bibliographique montre que la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* est riche en molécules très diverses qui couvrent une large gamme de propriétés. Dès lors, la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* présente un intérêt particulier, comme plante modèle, pour mettre



en œuvre des méthodologies d'extraction, d'analyses et d'identification de substances naturelles d'origine végétale.

### **I.3. Les antioxydants phénoliques naturels**

Les antioxydants phénoliques naturels sont des molécules d'avenir permettant une prévention efficace contre plusieurs maladies dont le cancer, le vieillissement, les maladies cardiovasculaires.... Ces molécules sont les composés polyphénoliques les plus abondants contenus dans les végétaux. Leur structure comprend plusieurs fonctions phénol donne à ces composés des propriétés antioxydantes, suivant la position des phénols et le milieu où la réaction prend place [37]. Les antioxydants présents dans les plantes sont souvent de type phénolique, peuvent être séparés entre les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

#### **I.3.1. Vue d'ensemble sur les polyphénols**

Les polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique porteur d'une ou plusieurs groupements hydroxyles libres, ils peuvent avoir plusieurs différents substituants (sucre, acide organique ...) [38]. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines ou la maturation des fruits.

Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes; les acides phénoliques, les coumarines, les stilbibènes les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables [39].

De nombreuses études sont en faveur d'un impact positif de la consommation des polyphénols sur la santé. Ils apparaissent parmi les antioxydants les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l'organisme [37].

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base [39].

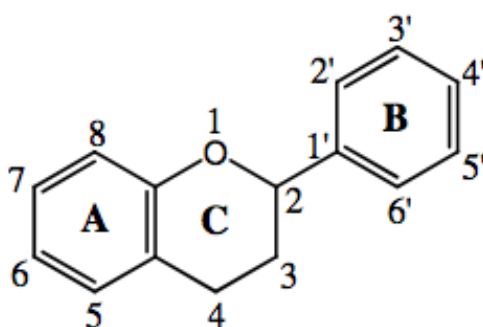
Notre intérêt est essentiellement focalisé sur les flavonoïdes, substances que nous avons pu identifier dans tous nos extraits et qui en particulier s'avèrent des composants phénoliques possédant une action biologique très diversifiée.

### I.3.1.1. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules. En effet plus de 6500 structures ont été identifiées [40,41].

#### I.3.1.1.1. Structure chimique et classification

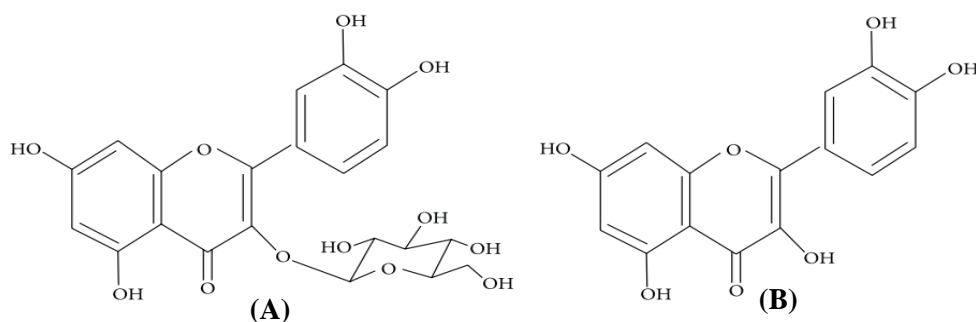
Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux), que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C [40] comme le montre la figure I-4.



**Figure I-4 : Structure de base des flavonoïdes.**

On remarquera qu'afin de distinguer les positions sur l'anneau A et celles sur l'anneau B, la nomenclature normalisée appose à ces dernières le symbole ' (prime). L'hétérocycle C est attaché au noyau B par une liaison carbone-carbone. De façon générale, les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5'et/ou 6'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, ou sulfatés [41].

La plupart des flavonoïdes, à l'exception de la sous-classe des catéchines, sont présents dans les plantes soit à l'état libre (dans ce cas ils sont dits aglycones ou génines), soit liées aux sucres sous forme de C- ou O- glycosides (Figure I-5), ce qui tend à les rendre hydrosolubles [42–44].

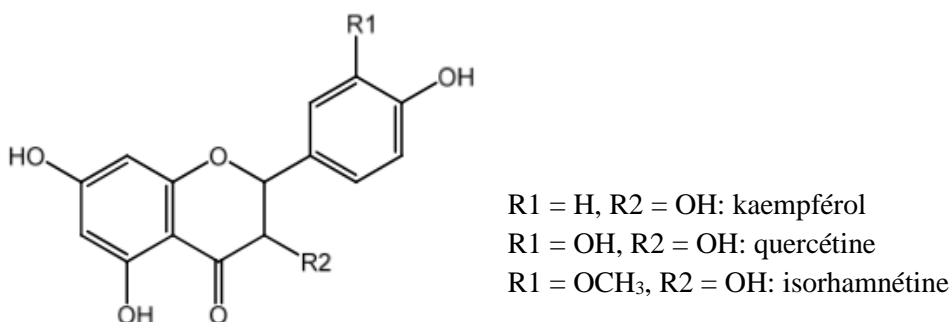


**Figure I-5 : Structure du (A) glycoside flavonoïde et (B) du flavonoïde aglycone.**

La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation, permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes :

- **Les flavonols**

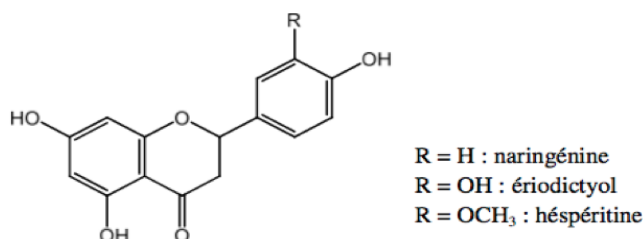
De nombreux travaux ont pu démontrer la richesse en flavonols et surtout en flavonols glycosylés des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*. Pour exemple, les travaux réalisés par Ammar et al. [26] ont permis de détecter sept flavonols glycosylés dans l'extrait méthanolique de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*. Parmi ces composés il a pu être démontré que les flavonols glycosylés majoritaires de la fleur étaient la quercétine-3-O-rutinoside (Rutin), la quercétine-3-galactoside, la quercétine-3-rhamnoside et l'isorhamnétine-3-O-glucoside. Les parties aglycones sont majoritairement représentées par l'isorhamnétine, la quercétine et le kaempférol (Figure I-6).



**Figure I-6 : Structures chimiques de flavonols**

- **Les flavanones**

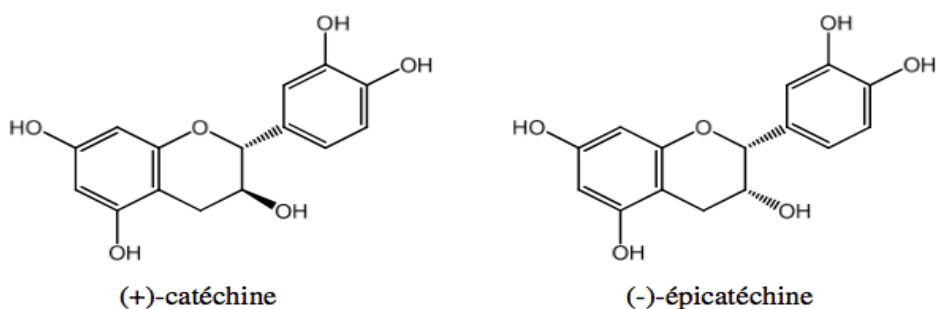
Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en positions 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie. Elles existent sous forme libre ou sous formes glycosylées. Sous forme libre, les carbones en position 5 et 7 sur le cycle A peuvent être hydroxylés ou méthoxylés. Le cycle B peut aussi être substitué en position 3', 4', 5' et 6'. La principale flavanone est : La naringénine.



**Figure I-7 : Structures chimiques de flavanones**

- **Les flavanols**

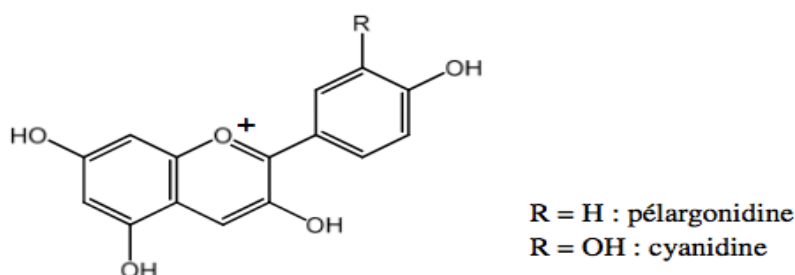
Ils se distinguent des flavanones par l'absence à la position 4 d'un atome d'oxygène relié au carbone par une double liaison la plus rencontré est la catéchine.



**Figure I-8 : Structures chimiques de flavan-3-ols**

- **Les anthocyanidines**

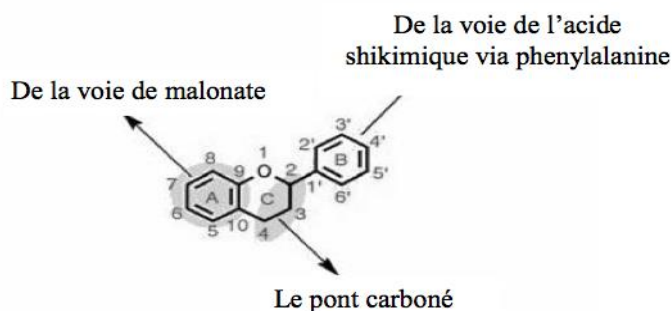
Les anthocyanidines ne possèdent pas de groupe OH à la position 4 et ont une double liaison entre les positions 3 et 4. Les plus importants sont : la pélagonidine, la cyanidine et la péonidine.



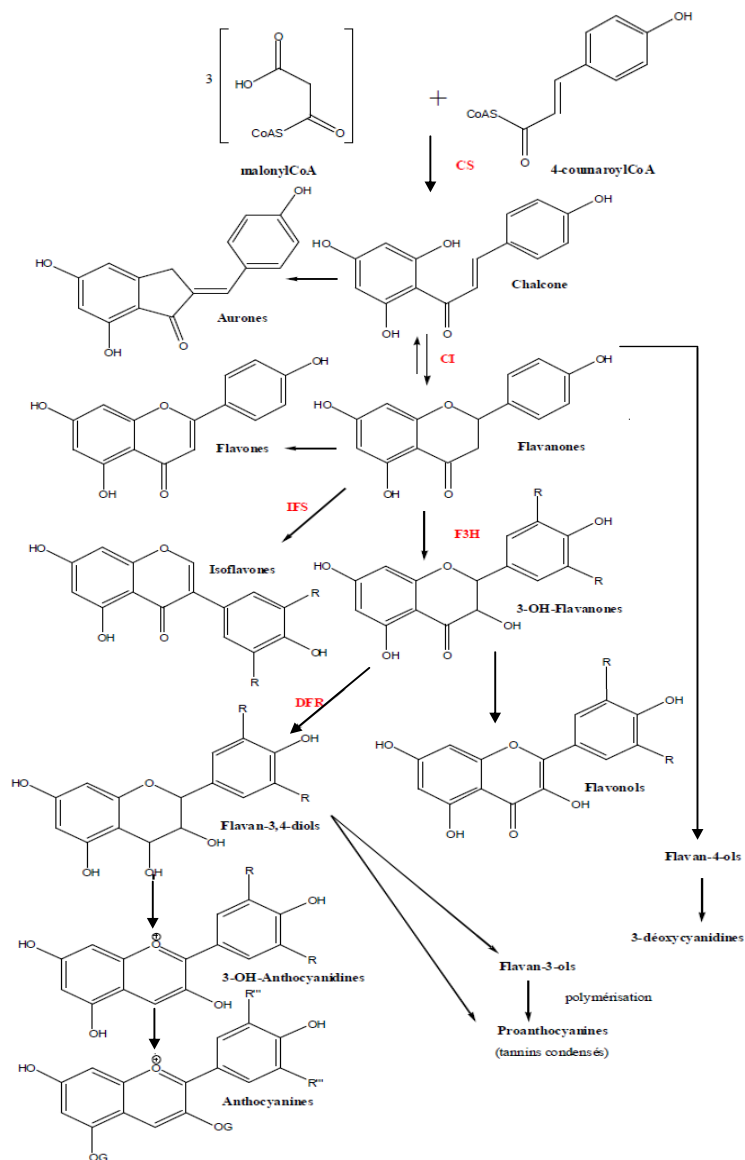
**Figure I-9 : Structures chimiques de deux anthocyanes**

### I.3.1.1.2. Biosynthèse des flavonoïdes

Au plan biosynthétique, l'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydroxycinnamique, en règle générale le 4- coumaroyl-CoA, pour obtenir la 4, 2, 4', 6'-tetrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthase) (Figure I-10). Dans les conditions physiologiques normales, cette chalcone tend à s'isomériser en flavanone sous l'action de la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à la seule (2S)-flavanone. Cette chalcone peut également se cycliser en aurone. Il est le précurseur de toutes les classes de flavonoïdes (Figure I-11).



**Figure I-10 : L'origine biosynthétique du squelette flavonique [45]**



**Figure I-11 : Biosynthèse des flavonoïdes.**

CS : chalcone synthase ; CI : chalcone isomérise ; F3H : Flavanone 3-hydroxylase ; IFS : isoflavone synthase ; DRF : dihydroflavonol reductase ; FS : flavonol synthase ; AS : anthocyanin synthase. R= -H, -OH ou -OCH<sub>3</sub> et OG= -O-sucré [43,45].

### **I.3.1.1.3. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des molécules bien tolérées chez l'homme, leur rôle est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes [46]. Ils sont également connus par leurs propriétés variées : anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique et antibactérienne [41].

Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques et protègent les artères contre l'athérosclérose et réduit la thrombose (caillots dans les artères) [47]. Il a été également démontré que certains composés des flavonoïdes possèdent des propriétés sédatives et anticonvulsives (contractions violentes et involontaires des muscles) [37].

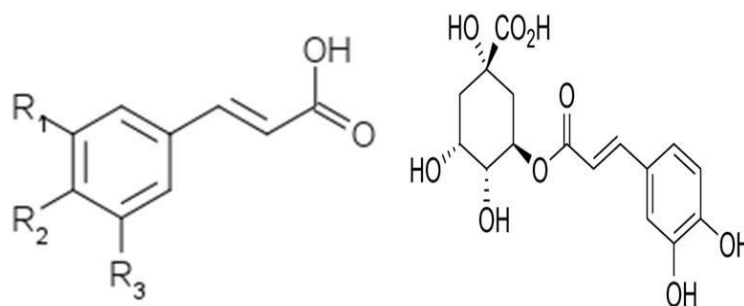
### **I.3.1.2. Les non-flavonoïdes**

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques et les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone ».

#### **I.3.1.2.1. Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure de base de type C6-C3 (Figure I-12). Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique qui a très largement démontré son activité antioxydante.

Les composés formés d'acides hydroxycinnamiques (acide caféique, férulique, para-coumarique, sinapique, diméthoxycinnamique) conjugués à l'acide quinique forment la classe des acides chlorogéniques.



$R_1=H, R_2=OH, R_3=H$ : Acide p-coumarique  
 $R_1=OH, R_2=OH, R_3=H$ : Acide caféique  
 $R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$ : Acide férulique  
 $R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=OCH_3$ : Acide sinapique  
 $R_1=OCH_3, R_2=OCH_3, R_3=H$ : Acide 3,4-diméthoxycinnamique

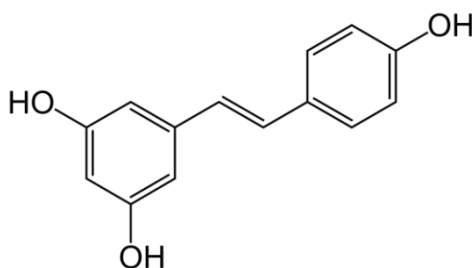
Acides chlorogéniques

**Figure I-12 : Structure de dérivés de l'acide p-hydroxycinnamique.**

### I.3.1.2.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué (Figure I-13). Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons  $\pi$  sur la totalité de la molécule.

Les plus abondants dans le raisin sont le trans-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide, ainsi que les dimères comme le resvératrol présent dans le raisin noir. Ce composé intervient également dans différents mécanismes biologiques (inhibition de l'aggrégation des plaquettes, antagonisme aux récepteurs à oestrogènes, propriétés antiinflammatoires, etc.).



**Figure I-13 : Structures chimiques de resvératrol**

### **I.3.2. Antioxydants phénoliques et radicaux libres**

Les polyphénols suscitent un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs, ils sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène [48].

L'activité antioxydante du composé phénolique est raisonnablement liée à leur structure, aux substitutions sur le cycle aromatique et à la structure de la chaîne latérale [49]. L'approche de la relation structure-activité antioxydante est considérée comme utile pour les applications alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques car elle fournit des preuves de la puissance des constituants phénoliques naturels

#### **I.3.2.1. Définition d'un radical libre**

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés [50], cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité. Il s'en suit une réaction en chaîne. Elle débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre [51].

Dans le corps humain, il existe une formation continue des radicaux libre eu cours de différents processus métaboliques : la synthèse des prostaglandines et la chaîne oxydatives mitochondriale [52].

Les antioxydants véritable système de défense de l'organisme face aux radicaux libre. Ce terme antioxydant est principalement utilisée pour deux groupes différents de substances : les produits chimiques industriels qui sont ajoutés et utilisés comme additifs pour prévenir l'oxydation et les produits chimiques naturels qui ont des effets bénéfiques sur la santé [53].

#### **I.3.2.2. Effets néfastes des radicaux libres sur la santé humaine**

Comme indiqué précédemment, s'ils sont en excès, les radicaux libres et les oxydants génèrent un phénomène appelé stress oxydatif, il s'agit d'un processus nocif qui peut affecter négativement plusieurs structures cellulaires, telles que les membranes, les lipides, les protéines, les lipoprotéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN) [54,55]. Dans le corps humain, il existe une formation continue des radicaux libre en cours de différents processus métaboliques (la synthèse des prostaglandines, la chaîne oxydatives mitochondriale...). Le



stress oxydatif apparait lorsqu'un déséquilibre existe entre la formation de radicaux libres et la capacité des cellules à les éliminer. Par exemple, un excès de radical hydroxyle et de l'ion peroxydant peut provoquer une peroxydation lipidique, endommageant ainsi les membranes cellulaires et les lipoprotéines. Ceci, à son tour, conduira à la formation des composés cytotoxiques et mutagènes. En tant que réaction en chaîne radicale, la peroxydation lipidique se propage très rapidement et touche un grand nombre de molécules lipidiques [52]. Les protéines peuvent également être endommagées par le stress oxydatif et subir des modifications pouvant entraîner une perte ou une altération de leur activité enzymatique [52,56]. Naturellement, les cellules peuvent mettre en place plusieurs mécanismes, tels que la réparation par excision de base ou par des antioxydants, comme réponse de défense contre les lésions de l'ADN [57]. S'il n'est pas strictement contrôlé, le stress oxydatif peut être responsable de l'induction de plusieurs maladies, tant chroniques que dégénératives, ainsi que de l'accélération du processus de vieillissement du corps et de l'apparition de pathologies aiguës (traumatismes et accidents vasculaires cérébraux).

Cancer et stress oxydatif : L'apparition du cancer chez l'homme est un processus complexe, qui nécessite des altérations cellulaires et moléculaires induites par des déclencheurs endogènes et/ou exogènes. Il est déjà bien connu que les dommages oxydatifs à l'ADN sont l'un des stimulés responsables du développement du cancer [58–60]. Le cancer peut être entraîné et/ou favorisé par des anomalies chromosomiques et l'activation d'un oncogène déterminée par un stress oxydatif. Les bases d'ADN hydrolysées sont des sous-produits courants de l'oxydation de l'ADN et sont considérées comme l'un des événements les plus importants de la carcinogenèse chimique [60]. La formation de tels types d'adduits altère la croissance cellulaire normale en modifiant le profil de transcription physiologique et en provoquant des mutations géniques. Le stress oxydatif peut également entraîner une quantité variée de modifications de la structure de l'ADN, par exemple des lésions de bases et de sucres, des liaisons transversales ADN-protéine, des ruptures de brins et des sites sans bases. Par exemple, le tabagisme, les polluants environnementaux et l'inflammation chronique sont des sources de dommages oxydatifs de l'ADN qui pourraient contribuer à l'apparition de tumeurs [56,60,61].

Maladie respiratoire et stress oxydatif : Plusieurs recherches ont montré que les maladies pulmonaires telles que l'asthme et la maladie pulmonaire obstructive chronique, déterminée par une inflammation chronique systémique et locale, sont liées au stress oxydatif [62–65]. Les radicaux libres au site d'inflammation jouent un rôle important dans l'initiation

et la progression de ce syndrome. Les oxydants sont connus pour renforcer l'inflammation via l'activation de différentes kinases impliquant des voies de transmission et des facteurs de transcription tels que NF-kappa B et AP-1 [64,65].

Maladies rénales et stress oxydatif : Le stress oxydatif est impliqué dans une multitude de maladies du système rénal, telles que la néphrite interstitielle glomérulaire et tubulaire, l'insuffisance rénale, la protéinurie et l'urémie [52,66]. Les reins sont affectés négativement par le stress oxydatif, principalement en raison du fait que la production des espèces réactives de l'oxygène induit le recrutement de cellules inflammatoires et la production de cytokines pro-inflammatoires, conduisant à un stade inflammatoire initial [66].

En résumé, nous pouvons affirmer que le stress oxydatif et les radicaux libres sont reconnus comme responsables de plusieurs affections pathologiques affectant différents tissus et systèmes, ce qui en fait l'un des dommages les plus importants et les plus répandus pour la santé humaine.

### **I.3.2.3. Antioxydants exogènes et santé humaine**

Le corps humain a mis en place plusieurs stratégies pour lutter contre les effets des radicaux libres et du stress oxydant, sur la base enzymatiques et non enzymatiques, des molécules antioxydantes, toutes étant des antioxydants endogènes. Outre ces molécules, il existe plusieurs molécules antioxydantes exogènes d'origine animale ou végétale, introduites principalement par l'alimentation ou par une supplémentation nutritionnelle. Nous aborderons ici sur l'activité antioxydant des flavonoïdes et leurs effets protecteurs sur la santé humaine.

Brièvement, les flavonoïdes sont une classe de composés polyphénoliques à structure benzo- $\gamma$ -pyrone, largement présents dans les aliments d'origine végétale (fruits, fleurs, huiles, graines, etc.) et responsables de plusieurs activités pharmacologiques (partie I.3.1.1.3. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes). Ces substances ont été étudiées en raison de leurs bienfaits potentiels sur la santé en tant qu'antioxydants, dont l'action est médiée par leurs groupes hydroxyles fonctionnels, capables de nettoyer les radicaux libres [67–70].

Ces études ont montré que le profil polyphénolique des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* pourrait être utilisé comme matières premières de départ pour la préparation des extraits actifs et riches en flavonoïdes.

Les extraits de haute qualité pouvant être utilisés comme ingrédients actifs pour la production alimentaire nutraceutiques et thérapeutique. L'extraction conventionnelle reste la principale approche pour obtenir des extraits actifs, cette technologie n'est pas alignée sur une

production « verte » et durable, car elle s'accompagne souvent de dépenses et d'élimination élevées de produits chimiques toxiques et d'énergie. De plus, cette technologie thermique a pu endommager les substances thermiquement instables qui sont supposés être extraits/produits en premier lieu. En outre, les options innovantes sont souvent plus sélectives, plus rapides, durables, thermosensibles, mais pas encore suffisamment testées leurs conditions et pratiques pour les applications industrielles.

#### **I.4. Méthodes d'extraction vertes « Eco-Extraction » pour les polyphénols des matrices végétales**

L'objectif principal d'un procédé d'extraction est de maximiser le rendement en composé cible avec un impact nul ou minime sur les propriétés du composé cible tout en minimisant l'extraction des composés indésirables. Les techniques conventionnelles d'extraction solide-liquide, y compris la macération, l'infusion, la décoction et l'extracteur « Soxhlet », prennent du temps et utilisent de grandes quantités de solvants [71]. Diverses nouvelles techniques, dont l'extraction assistée par ultrasons et l'extraction assistée par microondes, qui utilisent l'énergie ultrasonique [72] et microondes [73] respectivement comme source de chauffage de la solution solvant-matrice, ont été développées pour l'extraction des nutraceutiques des plantes afin de diminuer le temps d'extraction, de réduire la consommation de solvant, d'augmenter le rendement d'extraction, et améliorer la qualité des extraits. Ces techniques sont également appelées techniques d'extraction à froid, car la température pendant le processus d'extraction est relativement basse et n'affecte pas la stabilité des composés extraits. [72].

En janvier 2010, des chercheurs et professionnels de domaine de l'extraction des produits naturels ont défini l'Eco-Extraction et ses principes, présentés ci-dessous, pour développer aux industriels une chimie plus « durable » [74].

« L'Eco-Extraction est basé sur la découverte et la conception de procédés d'extraction permettant de réduire la consommation énergétique, mais aussi l'utilisation de solvants alternatifs et des ressources végétales renouvelables, tout en garantissant un extrait sûr et de qualité ».

Les six Principes de l'Eco-Extraction :

Principe 1 : Favoriser l'innovation par la sélection variétale et l'utilisation de ressources végétales renouvelables.

Principe 2 : Privilégier les solvants alternatifs et principalement ceux issus des agro-ressources.

Principe 3 : Réduire la consommation énergétique par l'assistance des technologies innovantes et favoriser la récupération d'énergie.

Principe 4 : Favoriser la création de coproduits au lieu de déchets pour intégrer la voie de la bio- ou agro- raffinerie.

Principe 5 : Réduire les opérations unitaires grâce à l'innovation technologique et favoriser les procédés sûrs, robustes et contrôlés.

Principe 6 : Privilégier un produit non dénaturé, biodégradable, sans contaminants et surtout porteur de valeurs : « éco-extrait ».

Les antioxydants naturels peuvent être extraits via différentes approches dans différentes conditions. La sélection de la méthode d'extraction joue un rôle essentiel et affecte fortement la nature et la quantité de composés phytochimiques extraits de la matrice végétales [1]. De plus, l'efficacité d'une méthode d'extraction est affectée par tous les paramètres du processus, par exemple composition du solvant, rapport solvant/solide, temps et température [2,3,75]. Les solvants de polarités différentes ont un effet significatif sur la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante. Récemment, des méthodes plus efficaces et respectueuses de l'environnement ont été développées pour extraire les composés phénoliques des matières végétales, notamment l'extraction assistée par ultrasons et l'extraction assistée par micro-ondes [4].

#### **I.4.1. L'extraction assistée par ultrasons (UAE, Ultrasonic Assisted Extraction)**

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est une technique alternative qui a récemment reçu beaucoup d'attention en raison de ses nombreux avantages dans la récupération des composés d'intérêts à partir de différentes matrices végétales par rapport aux méthodes classiques d'extraction.

##### **I.4.1.1. Principe de l'extraction UAE**

Les ultrasons sont des ondes mécaniques et élastiques. Les grandeurs physiques principales de l'onde ultrasonore sont la fréquence  $f$  (Hertz), la longueur d'onde  $\lambda$  (cm), la vitesse de propagation  $c$  (m/s) et la puissance  $P$  (W). Les ultrasons peuvent se différencier selon deux critères principaux : la fréquence et la puissance. Lorsque la puissance ultrasonore est suffisante, le passage de l'onde ultrasonore s'accompagne de phénomènes physiques non

linéaires et des transformations chimiques associées. On parle alors d'ultrasons de puissance dont l'émission est susceptible/apte de modifier le milieu traversé [59,62]. Lors d'une extraction solide-liquide par ultrasons, les ondes sont transmises à travers le milieu liquide et elles induisent un déplacement longitudinal des particules [76]. La source de l'onde sonore agit comme un piston, entraînant une succession de compressions et de décompressions des phases dans le milieu [72,73,77]. Les vides créés dans le liquide sont des billes de cavitation, qui améliore à la fois la pénétration du solvant dans le matériel végétal et la libération intracellulaire du produit en perturbant les parois cellulaires.

#### **I.4.1.2. Appareillage de l'extraction UAE**

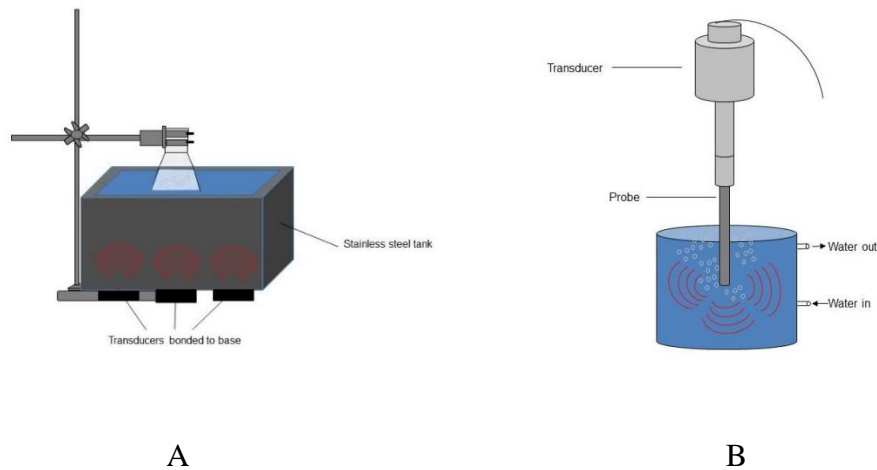
Les ultrasons de haute puissance peuvent être appliqués à l'aide de deux types d'appareils, bain à ultrasons ou équipement à ultrasons de type sonde. Les deux systèmes sont basés sur un transducteur comme source d'énergie ultrasonore. Le transducteur piézoélectrique est le type le plus couramment utilisé dans la majorité des réacteurs à ultrasons.

Le bain à ultrasons est le type d'appareil à ultrasons le plus connu. Il se compose généralement d'un réservoir en acier inoxydable avec un ou plusieurs transducteurs à ultrasons. Les bains à ultrasons fonctionnent généralement à une fréquence d'environ 40 kHz et peuvent être équipés d'un contrôle de température. Ils ne sont pas cher, disponibles et un grand nombre d'échantillons peuvent être traités simultanément. Cependant, par rapport aux systèmes de sondes, la faible reproductibilité et la faible puissance des ultrasons délivrés indirectement à l'échantillon sont des inconvénients majeurs. En effet, l'intensité délivrée est fortement atténuée par l'eau contenue dans le bain et la verrerie utilisée pour l'expérience (Figure I-14-A).

Les sondes ultrasoniques de haute puissance sont généralement préférées pour les applications d'extraction. Le système de sonde est plus puissant en raison d'une intensité ultrasonique délivrée à travers une surface plus petite (uniquement la pointe de la sonde) en comparaison avec le bain ultrasonique. Ils fonctionnent généralement à environ 20 kHz et utilisent un transducteur lié à une sonde qui est immergée dans le réacteur, ce qui entraîne une distribution directe d'ultrasons dans le milieu d'extraction avec une perte d'énergie ultrasonique minimale (Figure I-14-B).

Il existe plusieurs modèles de sondes de différentes longueurs, diamètres et géométries de pointe. La sélection de la sonde se fait en fonction de l'application et du volume

d'échantillon à soniquer. L'intensité des ultrasons délivrés par le système de sonde au milieu liquide induit une augmentation rapide de la température dans le réacteur. Donc le refroidissement du réacteur est nécessaire pour effectuer l'extraction.



**Figure I-14 : Systèmes à ultrasons (A : bain à ultrasons, B : sonde à ultrasons)**

#### **I.4.1.3. Avantages et inconvénients de la UAE**

La technologie de l'extraction assistée par ultrasons est considérée comme un processus respectueux de l'environnement, puisque l'extraction de molécules bioactifs naturels à partir des plants peut être effectuée en utilisant des solvants biodégradables (généralement eau ou mélanges eau/éthanol). Ces dernières années, la technique UAE a montré un intérêt particulier pour l'extraction d'antioxydants tels que les anthocyanines, les flavonols et les acides phénoliques. Comparée aux techniques d'extraction conventionnelles, dans la plupart des cas, UAE a permis une amélioration des rendements en un court temps d'extraction. Les ultrasons favorisent la diffusion des solutés dans le milieu d'extraction plus rapidement ce qui réduit le temps d'extraction, notamment, réduire la consommation d'énergie. Ainsi, UAE est une alternative potentielle pour extraire les substances thermosensibles. Cependant, pour une application réussie de l'UAE, il est nécessaire d'optimiser les paramètres variables de l'extraction, telles que la puissance et la fréquence d'ultrasons appliquées, le solvant utilisé, le rapport liquide/solide et la température d'extraction [73,78,79].

L'UAE peut être utilisée au laboratoire ou à un niveau industriel pour collecter des composés intéressants comme des antioxydants, des colorants des huiles essentielles ou des

arômes. Par contre, les coûts de l'investissement sont un peu plus élevés que ceux de l'extraction conventionnelle.

En résumé, L'UAE est considérée comme une technologie verte et permet de répondre à deux principes de l'éco-extraction du végétal, notamment, au principe numéro 2 « en privilégiant les solvants alternatifs et principalement ceux issus des agro-ressources », et au principe numéro 3 par « la réduction de la consommation énergétique par l'assistance des technologies innovantes et favorise la récupération d'énergie » avec une rentabilité élevée.

#### **I.4.2. L'extraction assistée par microondes (MAE, Microwave Assisted Extraction)**

La méthode d'extraction assistée par microondes est l'une des méthodes avancées actuellement utilisées pour récupérer les polyphénols.

Initialement, toutes les technologies appelées collectivement « processus assistés par micro-ondes (MAP) » ont été développées et brevetées par le ministère canadien de l'Environnement (Centre des technologies environnementales). Ces méthodes ont été développées pour l'extraction de composés bioactifs à partir de diverses matrices végétales ciblées et de leurs sous-produits. De nombreux travaux de recherche publiés indiquent que cette technique est également reconnue comme une technologie de processus propre avec plusieurs avantages environnementaux, économiques et sociaux [80].

##### **I.4.2.1. Principe de d'extraction MAE**

Les microondes font partie du spectre électromagnétique avec une plage de longueurs d'onde de 300 MHz à 300 GHz. L'onde électromagnétique est caractérisée par deux paramètres : la fréquence  $f$  (Hertz) et la longueur d'onde  $\lambda$  (m) [73]. Le principe du chauffage d'une matière par microondes repose sur deux mécanismes [80]. Le premier est connu sous le nom de chauffage diélectrique, provoqué par la rotation du moment dipolaire. Les molécules tournent en fonction des moments dipolaires et se randomisent instantanément avec la fréquence des microondes. Ce mouvement moléculaire provoque l'échauffement de la matière. Le deuxième mécanisme est appelé conduction ionique. Les ions sont alignés avec le champ électromagnétique tel que le rayonnement microondes. Le frottement entre le flux d'ions et le reste du solvant se traduit par libération de la chaleur. Selon la polarité du solvant et la présence d'ions dans le solvant, les deux mécanismes peuvent se produire simultanément.

Dans cette technique l'assistance des microondes permet de chauffer le solvant très rapidement avec peu d'énergie. La matrice végétale est homogénéisée et mélangée avec un solvant chauffé pour une court période de temps. Généralement, le chauffage est répété plusieurs fois avec des périodes de refroidissement pour éviter l'ébullition.

La sélection des solvants dans le MAE est très importante. Dans d'autres méthodes d'extraction, les solvants sont choisis en fonction de leur affinité pour les composants actifs. En cas de MAE, l'affinité n'est pas le seul facteur. La capacité d'absorber le rayonnement microondes est le principal facteur des solvants. Des solvants de polarités différentes à partir du n-hexane jusqu'au Méthanol, ou même de l'eau, qui sont généralement utilisés pour l'extraction conventionnelle de produits naturels, peuvent être utilisés dans les méthodes d'extraction par microondes. Cependant, il existe également des protocoles MAE sans solvant, où l'utilisation de solvant d'extraction n'est pas nécessaire, principalement utilise pour récupérer les huiles essentielles lorsque l'eau contenu dans la matrice [1,81,82].

Les polyphénols peuvent être extraits par MAE. L'échantillon contenant des polyphénols polaires, tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes, est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes. Dans ce cas, la température du solvant augmente, les structures cellulaires encapsulant les polyphénols peuvent être détruites à des températures suffisamment élevées et libérant les polyphénols dans le solvant.

#### **I.4.2.2. Appareillage de l'extraction MAE**

La méthode d'extraction assistée par microondes est l'une des méthodes avancées actuellement utilisées pour récupérer les polyphénols.

Les fours à microondes ou les équipements personnalisés sont facilement disponibles à faible coût. Avec de nombreuses applications techniques, le four à microondes est un appareil de cuisine essentiel dans les modes de vie modernes pour cuire ou réchauffer des aliments. L'utilisation facile, rapide et propre des fours à microondes rend le processus plus attrayant. Il empêche également la surchauffe des aliments, évitant le brunissement ou la caramélisation, car la température reste autour du point d'ébullition du liquide.

Les systèmes de four microondes commercialisés et adaptés aux laboratoires sont constitués de cinq éléments principaux [83] :

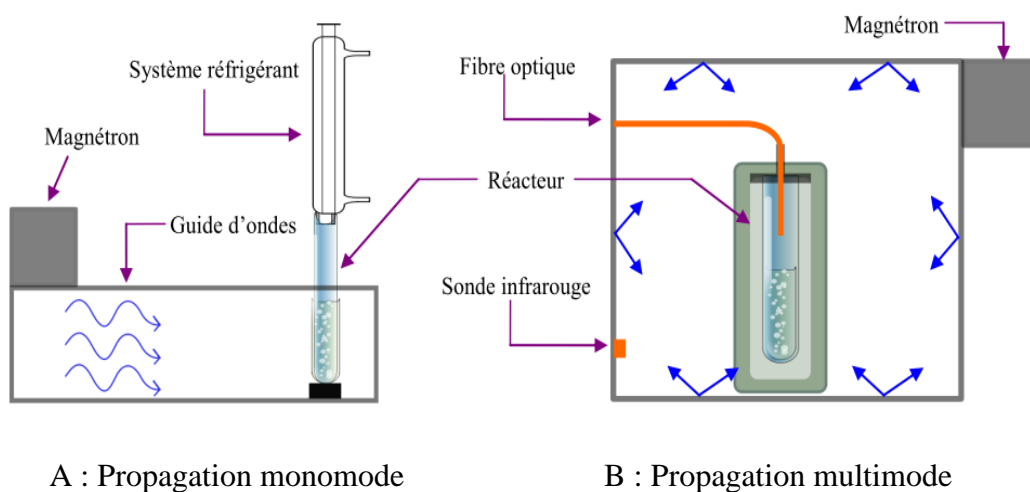
- un générateur de microondes, aussi nommé magnétron, qui va générer les micro-ondes à partir d'énergie électrique ;



- un guide d'ondes métallique qui va propager les microondes du magnétron à l'échantillon ;
- un réacteur transparent aux microondes dans lequel est disposé l'échantillon ;
- une cavité protectrice (ou four), dans laquelle le réacteur sera placé ;
- un système de contrôle des températures.

L'application de l'irradiation microonde sur l'échantillon peut être réalisée soit avec un applicateur d'onde monomode ou avec un applicateur à cavité multi-modes (Figure I-15). L'applicateur d'onde monomode ne permet qu'un seul mode de propagation de l'onde, qui est orienté par le guide d'ondes. Ainsi la radiation micro-onde est restreinte à une certaine zone dans laquelle se situe l'échantillon. Les applicateurs à cavité multi-modes permettent la dispersion de manière aléatoire des ondes à l'intérieur d'une cavité. L'échantillon, placé à l'intérieur de la cavité, est agité ou mis en mouvement de manière à ce que tout le contenu soit irradié de manière homogène [82,83].

D'autre part, l'extraction dans le réacteur peut être mené de deux façons différentes : soit à pression atmosphérique (système ouvert), soit sous atmosphère pressurisée (système fermé). Le premier, connu sous le nom d'extraction focalisée assistée par microondes, utilise des réacteurs ouverts surmontés d'un système de condensation des vapeurs [84]. Le deuxième type d'extraction utilise des réacteurs fermés, et de surcroît sous pression, ce qui permet de travailler à des températures supérieures au point d'ébullition des solvants utilisés. Ce système est appelé extraction sous pression assistée par microondes [82–84].



**Figure I-15 : Représentation schématique de fonctionnement et mécanisme du système d'extraction assistée par microondes (MAE). a) Système FMAE (ouvert). b) Système PMAE (fermé) sous des conditions d'irradiations microondes respectivement monomode (A) et multimode (B) [82].**

#### **I.4.2.3. Avantages et inconvénients de MAE**

L'efficacité de cette méthode s'approche de celle de l'extraction classique Soxhlet, mais avec l'avantage de pouvoir être réalisée beaucoup plus rapidement [85], un rendement amélioré, une meilleure précision et une adaptation aux composants chimiques thermolabiles [82,86].

Les microondes sont considérées comme une bonne option pour l'extraction ciblée en raison de leurs avantages comme un chauffage efficace à l'intérieur d'un récipient fermé, une perte moindre ou nulle de solvant, aucune fuite pour les métabolites et un temps d'extraction raccourci. Le rendement des métabolites végétaux peut être encore optimisé en augmentant la pression et en diminuant la température à l'intérieur du récipient pour les composés sensibles à la chaleur [73,82,83,86,87]. L'inconvénient de cette technique est la nécessité de maîtriser parfaitement le temps de chauffage par microondes pour l'extraction de composés thermosensibles. Elle nécessite également une bonne connaissance des propriétés diélectriques des molécules dans le système [83].

#### **I.4.2.4. Effets de l'application d'eau comme solvant d'extraction des flavonoïdes assistée par microonde**

L'eau a été signalée comme un excellent solvant pour l'extraction des flavonoïdes polaires [88]. Cela peut être attribué à la grande solubilité de ces composés dans l'eau et à leurs propriétés diélectriques combinées. L'eau est également une composante intégrée de différentes solutions. Pour moduler les propriétés diélectriques de divers autres solvants purs (acides, composés inorganiques et organiques), ils sont combinés avec de l'eau pour obtenir des solutions ayant les propriétés diélectriques et chauffantes requises [89].

L'eau est également une partie importante de la plupart des matrices biologiques, qui représentent souvent plus de 70% du matériel cellulaire. Dans certaines études, l'extraction par microondes a été réalisée sans l'ajout de solvants ni l'ajout d'eau [90]. Cela pourrait être possible dans le cas de matrices biologiques à forte teneur en eau, où les applications microondes peuvent entraîner une dégradation cellulaire par génération à haute pression. Grâce au chauffage diélectrique de l'eau présente à l'intérieur des cellules, une désintégration supplémentaire des biomolécules est également possible. Cependant, dans la plupart des cas, l'application de concentrations optimisées de solvants a été encouragée.

Dans cette technique MAE, des températures élevées sont atteintes en très peu de temps et les propriétés des liquides changent à des températures très élevées. La polarité de

l'eau diminue sensiblement à des températures plus élevées. Sa viscosité et sa tension superficielle augmentent également à des températures plus élevées, conduisant à une diffusivité considérablement accrue du solvant dans la matrice biologique, améliorant par la suite la récupération de molécules ciblées. Selon Mustafa et Turner [91], cela fait de l'eau un excellent solvant pour l'extraction réussie de composés avec toutes sortes de polarités (hautement polaires ainsi que moins polaires et modérément polaires) en cas d'extraction à haute pression. Cependant, le même principe peut être efficace en cas d'extraction par microondes.

Par conséquent, la combinaison de techniques efficaces telles que l'extraction par microondes et de solvants diélectriques tels que l'eau peut conduire à des rendements d'extraction élevés de flavonoïdes. Ainsi, l'absence des traces de solvant toxiques et les produits dans les extraits obtenus peuvent être considérés comme un produit non dénaturé, biodégradable et sans contaminants.

En résumé, MAE est une approche alternative aux procédés classiques d'extraction pour la récupération des substances d'intérêt, compte tenu de la possibilité d'augmenter les rendements, réduire le temps d'extraction et limiter les effets de dégradation des substances thermosensibles. La méthode MAE offre également la possibilité de travailler avec des solvants biodégradables ou sans solvant, permettant de répondre au deuxième principe de l'éco-extraction du végétal « en privilégiant les solvants alternatifs et principalement ceux issus des agro-ressources », et au troisième principe par « la réduction de la consommation énergétique par l'assistance des technologies innovantes et favorise la récupération d'énergie ». L'utilisation de l'eau comme solvant pour MAE permet également de répondre au sixième principe de l'éco-extraction du végétal en permettant la production d'extrait porteur de valeur « éco-extrait ».

### **I.5. Extraction solide- liquide**

Les procédés d'extraction solide-liquide, aussi bien traditionnels (macération, infusion et décoction) que ceux introduits plus récemment (extraction assistée par ultrason (UAE) ou microonde (MAE)), reposent sur deux principes fondamentaux : la diffusion et/ou l'osmose.

L'extraction solide-liquide est la technique la plus ancienne et la plus utilisée dans les industries agroalimentaires, cosmétiques, parfumeries et pharmaceutiques.

### **I.5.1. Principes et mécanismes de l'extraction solide-liquide**

L'extraction solide-liquide est une technique physique de transfert de matière entre une phase solide, qui contient la substance à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction [92].

Suite au contact entre la matrice et le solvant, les substances ayant une affinité pour le solvant sont solubilisées et passent de la phase solide vers la phase liquide. Au cours de l'extraction, leurs concentrations diminuent dans la phase solide et augmentent dans la phase liquide. Le transfert de matière se réalise par diffusion moléculaire. L'extraction est un processus non stationnaire qui s'arrête au moment où s'établit un équilibre entre les deux phases. Cependant si le solvant est continuellement renouvelé, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide [93]. Les constituants recherchés peuvent être soit les substances solubles, soit le résidu solide. L'extraction n'est pas une opération sélective. En plus des molécules ciblées, d'autres substances sont également extraites à partir de la phase solide vers le solvant [94].

Au cours de l'extraction plusieurs étapes successives peuvent être distinguées [92] :

- Pénétration du solvant dans la matrice solide,
- Dissolution du soluté dans le solvant,
- Diffusion du soluté vers l'extérieur de la matrice solide,
- Transfert du soluté vers la phase liquide.

Après l'extraction, l'extrait obtenu est séparé du solide épuisé par filtration ou centrifugation. Finalement, un extrait sec peut être obtenu par un séchage approprié (par exemple : lyophilisation). Dans certains cas, la matière végétale est prétraitée avant l'extraction pour améliorer le contact entre les phases. Le séchage, la sélection et le broyage sont souvent utilisés comme opérations de prétraitement.

### **I.5.2. Paramètres influençant l'extraction solide-liquide**

De nombreux paramètres peuvent influencer une opération d'extraction solide-liquide. Il est important de les maîtriser afin d'assurer une extraction efficace. Les paramètres majeurs peuvent avoir une influence essentielle sur le rendement d'extraction et la qualité de l'extrait : la nature et le volume du solvant, le temps et la température d'extraction, et le rapport solide/liquide.

## **Nature et volume du solvant**

Le choix du solvant d'extraction est essentiel pour obtenir un processus d'extraction optimal. Ce choix est déterminé par la solubilité des molécules d'intérêt sans les altérer et par les interactions solvant-matrice. Une faible viscosité du solvant favorise sa pénétration dans la matrice solide ainsi que le transfert de matière au sein de la phase liquide. Le volume de solvant doit être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant l'extraction. Les rapports optimums liquide : solide, le plus souvent trouvés dans la littérature scientifique, sont généralement situés entre 10:1 et 50:1 (mL : mg). Les aspects de coût, sécurité, toxicité et durabilité doivent également être pris en compte [95]. Aujourd'hui, les solvants les plus utilisés pour l'extraction de substances naturelles sont le méthanol, l'hexane, le cyclohexane, l'acétone et le dichlorométhane. Ces solvants organiques sont toxiques, ils posent des problèmes de santé et des problèmes environnementaux. Les solvants tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'eau ainsi que leurs mélanges sont les plus utilisés pour l'extraction des composés phénoliques. Les mélanges extraient mieux les molécules ciblées que les solvants purs [2,93,96,97]. Néanmoins, l'éthanol, l'eau et leurs mélanges sont les plus habituellement utilisés lorsque les extraits sont destinés à la consommation humaine, puisqu'ils sont considérés comme des solvants de qualité alimentaire et pas chers [98].

## **Temps et Température**

Le temps et la température d'extraction sont des paramètres importants à optimiser, afin de minimiser le coût énergétique du procédé.

La récupération des composés phénoliques à partir de matrices végétales est influencée par la durée de l'extraction. Les résultats concernant la durée d'extraction optimale des polyphénols sont assez contradictoires [98]. Certains auteurs préconisent de courtes durées d'extraction de 5 à 30 min [98–101] alors que d'autres montrent la nécessité de plus longs temps de contact de 1 à 24 h [97,102]. Néanmoins, un temps trop long augmente les chances d'une oxydation des polyphénols. Ceci aurait pour conséquence, une diminution du rendement d'extraction et de l'activité antioxydante des extraits [96].

L'augmentation de la température favorise l'extraction car elle permet de réduire la viscosité du solvant, améliorant ainsi la pénétration du solvant dans la matrice végétale, d'augmenter la solubilité des composés et leurs coefficients de diffusion [97]. De plus, les parois cellulaires sont rendues plus perméables par la chaleur [91]. Cependant, l'augmentation de la température n'a pas toujours un effet bénéfique. Une température excessive peut provoquer une dénaturation des produits à extraire. Elle peut également affecter la stabilité

des composés phénoliques [97]. Plusieurs études ont montré une thermodestruction de certaines composés phénoliques à températures élevées (plus de 45 °C) [97,101,103,104].

Le couple temps-température a montré son importance dans l'extraction de polyphénols puisque à température d'extraction modérée, un temps de contact plus grand entre la source et le solvant peut être nécessaire pour atteindre des rendements équivalents à ceux obtenus lorsque la température est plus élevée et le temps d'extraction plus court [105]. Ainsi, les paramètres temps et température sont importants pour la stabilité des polyphénols dans les extraits et pour la qualité et l'intégrité des produits finalement obtenus.

### **Rapport solide-liquide**

Le rapport solide-liquide peut être augmenté en augmentant le volume de liquide ou en diminuant la quantité de solide. Cependant, augmenter le volume de solvant, hormis les considérations relatives à la toxicité du solvant, pourrait influencer le coût économique et énergétique de l'extraction, diluer le soluté et allonger la procédure d'extraction puisque l'élimination du solvant en fin de procédé serait plus longue et plus coûteuse économiquement et énergétiquement [106]. Néanmoins, des rapports solide/liquide trop faibles pourraient diminuer la pénétration du solvant dans la matrice végétale et causer des problèmes de saturation du soluté dans le solvant.

## **I.6. Objectif de projet : La valorisation des produits de terroir au Maroc par ses substances naturelles**

L'utilisation des produits de terroir pour fabriquer des ingrédients actifs thérapeutiques par des méthodes innovantes et écologiques, est une contribution à la valorisation de ces produits locaux tout en assurant une gestion durable des ressources naturelles et biologiques.

Les extractions assistées par ultrasons et par microonde ont montré leurs efficacités pour l'extraction des antioxydants naturels à partir de sources variées. Elles ressortent donc comme un procédé intéressant pour extraire les composés bioactifs. Cette étude bibliographique montre que la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*, qui fait partie d'un produit de terroir très peu valorisés jusqu'à présent, est riche en molécules très diverses qui couvrent une large gamme de propriétés thérapeutiques. Par conséquent, la fleur d'*Opuntia* présente un intérêt particulier, comme plante modèle, pour mettre en œuvre des méthodologies d'extraction innovantes, de fractionnement, d'analyse et d'identification de produits naturels d'origine végétale.

Dans ce contexte, le travail de cette thèse a pour l'objectif de participer à mieux valoriser la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* par le développement et l'optimisation de deux techniques d'extractions innovantes : extraction hydroalcoolique assistée par ultrason (UAHE) et extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE). Ces techniques d'extractions ont été optimisées par un plan d'expérience, afin d'obtenir un extrait hydroalcoolique par UAHE et un extrait aqueux « éco-extrait » par MAAE, les plus riches en polyphénols et donnent une activité antioxydante la plus élevée.

## Chapitre II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

### II.1. Matériel végétal :

#### II.1.1. Situation du lieu de récolte et conduite technique

Les fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* ont été récoltées après leur dessèchement dans la région de Skhour Rhamna, au Maroc (32° 28' 53" de latitude nord ; 7° 58' de 38,2" de longitude est ; altitude : 452 m) en saison 2016. Les fleurs ont été réduites en poudre grossière qui a servi pour la préparation des extraits.

#### II.1.2. Classification taxonomique

Elle a été effectuée par le Dr. OUHAMMOU Ahmed botaniste à l'Université Cadi Ayyad de Marrakech au Maroc. Un spécimen de référence, désigné par 11335, a été déposé dans l'herbier scientifique 'MARK' de l'Université Cadi Ayyad à Marrakech.

### II.2. Caractérisation physico-chimique de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*

#### II.2.1. Teneur en eau : Humidité

Le taux d'humidité, dans notre échantillon (la poudre des fleurs sèches d'*Opuntia ficus-barbarica*), a été déterminé par le procédé de dessiccation à une température de 105° C dans une étuve isotherme jusqu'à l'obtention d'un poids constant [107].

Considérons :

x : Poids de l'échantillon ;

y : Poids de l'échantillon après séchage ;

T% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage ;

$$T\% = [(x-y)/x] * 100 ;$$

Pour plusieurs mesures, on calcule l'humidité moyenne :

$$T\%(Moy) = [T_1\% + T_2\% \dots + T_n\%] / n$$

n : Nombre totale d'échantillon ;

Moy. : Moyenne ;



### **II.2.2. Teneur en cendres**

Les teneurs en cendres sont déterminées selon la méthode AOAC [107] par incinération de la matière sèche des feuilles et des écorces d'oranges dans un four à moufle (Karl Kolb Scientific Technical Supplies, D-6072) à une température de 550°C pendant 4 heures.

### **II.2.3. pH (Potentiel d'hydrogène)**

La mesure du pH est effectuée sur la poudre avec un pH-mètre selon la méthode décrite par AFNOR [108]. Une prise d'essai de 1g est dissoute dans un volume de 50 mL d'eau distillée, et l'ensemble est laissée sous agitation pendant 30 minutes. Une fois filtré, la mesure est réalisée en trois répétitions.

### **II.2.4. Activité d'eau**

La détermination de l'activité de l'eau (*aw*) est assurée par un appareil NOVASINA (AW Sprint TH-500) à une température de 25 °C. Une cuvette correctement séchée et remplie à environ 2/3 de produit est placée dans la chambre de mesure. Dès que la valeur d'*aw* est stable, un signal retentit et la lecture est effectuée.

### **II.2.5. Propriétés fonctionnelles**

#### **II.2.5.1. Pouvoir de gonflement (PG)**

500 mg d'échantillon en poudre sont hydratés par 20 mL d'eau distillée dans un tube graduée. Après équilibration (environ 16h), le volume de l'échantillon est noté et est exprimé en mL d'eau par g de produit [109].

#### **II.2.5.2. Pouvoir de rétention d'eau (PRE)**

L'absorption d'eau a été déterminé en préparant une pâte à fleurs saturée et homogène. 100 mg d'échantillon en poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* sont trempés dans de l'eau distillée pendant 24 heures. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 25 minutes à 2000 g. Le surnageant est éliminé soigneusement par aspiration [109]. Le résultat est exprimé en g d'eau / g de poudre de la fleur sèche.

#### **II.2.5.3. Pouvoir de rétention d'huile (PRH)**

Le PRH est mesuré par addition d'huile de tournesol (10 mL) à 100 mg d'échantillon en poudre. Le mélange est ensuite centrifugé à 2000 tours/minute pendant 20 minutes. Le PRH est exprimé en g d'huile retenue/g de poudre de la fleur sèche. [109].

### **II.2.6. Teneur en matière grasse**

La détermination de la teneur en matière grasse est réalisée par extraction en continue avec un système Soxhlet [107]. Le solvant utilisé est l'éther de pétrole à une température de 40 °C. Un échantillon de 3 g de la poudre de fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* est introduit dans la cartouche d'extraction de l'appareil de Soxhlet contenant 100 mL d'éther de pétrole. L'extraction dure 6 heures. Le solvant est récupéré par distillation sous vide. Le ballon contenant la matière grasse et le résidu de solvant est mis dans l'étuve à 105 °C pendant une heure pour enlever le résidu de solvant puis pesé afin de déterminer la teneur en matière grasse.

### **II.2.7. Teneur en sucres totaux**

La teneur en sucres totaux est déterminée par la méthode de Dubois [110]. 1g de la poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* est mélangée avec 50 mL d'eau distillé, et laissée sous une agitation pendant 45 minutes à température ambiante. Une filtration est réalisée afin de récupérer le filtrat.

Pour un 1 mL du filtrat sont ajoutés respectivement, 1 mL de phénol à 5% et 3 mL d'acide sulfurique, le mélange est mis à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à une température ambiante. L'absorbance est mesurée à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un témoin.

La teneur en sucres totaux dans la poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage qui est réalisée en utilisant le glucose dans les mêmes conditions opératoires.

### **II.2.8. Teneur en protéines**

Le dosage des protéines totales est réalisé selon la méthode de Bradford [111]. Cette méthode colorimétrique permet de déterminer la concentration d'une solution protéique.

Une prise d'essai de 1g de la poudre est diluée dans 50 mL d'eau distillé. L'ensemble est agité pendant 30 minutes, avant d'être filtrée.

Un volume de 100 µl est additionné de 3 mL de bleu de coomassie, et l'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un témoin.

La teneur en protéines de la poudre est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée en utilisant le sérum albumine bovine dans les mêmes conditions opératoires.

### II.2.9. Teneur en fibres brutes

La détermination de la teneur en fibres brutes (insoluble) par le traitement de substance successivement avec une solution bouillante d'acide sulfurique et une solution d'hydroxyde de potassium. Hydrolyse acide/basique permet de solubiliser la totalité du contenu cellulaire sauf les fibres alimentaires et les sels minéraux [112].

Les matières cellulosiques constituent du résidu organique obtenu après deux hydrolyses successives l'une dans un milieu acide et l'autre dans un milieu alcalin avec neutralisation après chaque attaque. Le résidu est séparé par filtration, séché et pesé puis calciné à 700 °C pendant 2 heures.

La teneur en fibres brutes est calculée par la formule présentée ci-dessous :

$$\text{La teneur en cellulose brute (\%)} = \frac{a - b}{m} * 100$$

Avec :

- m : la masse (g), de la prise d'essai
- a : le résidu d'hydrolyse y compris la cendre (g)
- b : la cendre (g) du résidu d'hydrolyse

### II.2.10. Couleur

La couleur de la farine a été déterminée par la mesure L\* a\* b\* paramètres de Hunter Lab échelle avec un spectrocolorimètre de liquide. La solution liquide de farine a été préparé par un mélange avec le rapport 1:10 (farine de la fleur : l'eau distillée) suivie d'une centrifugation pendant 10 min à la vitesse de 2800 tours/minute suivi d'une filtration.

### II.2.11. Teneur en substances extractibles par l'eau

Nous avons introduit 1g de poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* (PF) dans 20 mL d'eau distillée, puis faire une décoction de 15 minutes. Nous avons laissé refroidir et filtré sur un papier filtre. Peser une capsule vide (n) et mettre le filtrat dans cette capsule, ensuite évaporer à sec et peser la capsule avec l'extrait sec (n').

Les substances extractibles par l'eau (SE/eau) ont été évaluées par la formule :

$$\text{SE/eau} = \frac{(n' - n)}{\text{PF}} \times 100$$

### II.2.12. Teneur en substances extractibles par l'éthanol

Nous avons introduit 1g de poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* (PF) dans 20 mL d'éthanol, puis faire une macération de 24 heures à la température ambiante. Après filtration, peser une capsule vide (n) et mettre le filtrat dans cette capsule, ensuite évaporer à sec et peser la capsule avec l'extrait sec (n').

Les substances extractibles par l'éthanol (SE/ éthanol) ont été évaluées par la formule :

$$\text{SE/éthanol} = \frac{(n' - n)}{\text{PF}} \times 100$$

### II.3. Extractions conventionnelles

L'extraction solide-liquide classique est réalisée à différentes températures, durées et vitesses d'agitation. Pour limiter l'évaporation du solvant et la dégradation ou oxydation des composés phénoliques par l'air et la lumière, les erlenmeyers sont fermés et couverts de papier aluminium pendant le procédé d'extraction. Les techniques d'extractions liquide-solide utilisées sont : l'infusion, la macération et la décoction.

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement chauffé que l'on laisse refroidir. Le terme désigne aussi les boissons, comme les tisanes et le thé, préparées par cette méthode.

La décoction consiste à réaliser l'extraction à température d'ébullition du solvant.

La macération est une méthode d'extraction liquide-solide similaire à l'infusion qui s'effectue à la température ambiante. Elle est également utilisée pour l'extraction de composés sensibles à la chaleur.

#### II.3.1. Extraction solide-liquide aqueuse par infusion et décoction

L'extraction est faite par infusion à 40°C, infusion à 80°C, et par décoction à 100°C pendant différentes durées.

Les échantillons sont préparés de la manière suivante :

##### II.3.1.1. Infusion :

3g de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* ont été ajoutés à 300 mL d'eau. Le mélange est laissé infuser à températures de 40 °C pendant 15min (I40°15'), 30min (I40°30') ou 120 min (I40°120') et à températures de 80 °C pendant 5min (I80°5'), 30min (I80°30') ou 120 min (I80°120').

### II.3.1.2. Décoction :

3g de fleur de figuier de barbarie ont été ajoutés à 300 mL d'eau. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 5min (D5'), 15min (D15') ou 30min (D30').

Les solutions obtenues sont ensuite filtrées, les filtrats sont concentrés sous vide sur un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide abaissant le point d'évaporation de l'eau à 50 °C. L'extrait concentré est congelé pendant 24 heures puis placé sur un lyophilisateur.

L'extrait lyophilisé est récupéré, pesé, étiqueté et conservé à +4 °C jusqu'à l'utilisation.

### II.3.2. Extraction solide-liquide par macération

Les différents rapports (éthanol-eau) de solvants utilisés dans les trois macérations :

M.H<sub>2</sub>O : Macération avec eau distillée

M.EtOH50 : Macération hydroalcoolique : Ethanol-eau (50/50),

M EtOH80 : Macération hydroalcoolique : Ethanol-eau (80/20).

Les échantillons sont préparés de la manière suivante :

3 g du matériel végétal sèche ont été pesés puis mélangés avec un volume de 300 mL du solvant. Le mélange est laissé sous agitation magnétique pendant 24 heures à température ambiante. La solution obtenue est ensuite filtrée sur papier filtre sur un dispositif Büchner sous vide. Le filtrat est ensuite récupéré et le résidu est lixivié avec le solvant d'extraction correspondant.

Le volume total du filtrat est concentré sous vide sur un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide abaissant le point d'évaporation du solvant (l'eau à 50 °C et les mélanges éthanol-eaux à 40 °C). L'extrait concentré est congelé pendant 24 heures puis placé sur un lyophilisateur.

Après 48 heures, l'extrait lyophilisé est récupéré, pesé, étiqueté et conservé à + 4 °C jusqu'à utilisation. Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Rdt (\%)} = (\text{M}_{\text{lyoph}} / \text{M}_{\text{g}}) \times 100$$

Avec : M<sub>lyoph</sub> = masse du lyophilisat ; M<sub>g</sub> = masse de la plante.

## **II.4. Extractions innovantes**

A partir des données bibliographiques et du contexte actuel, notre travail s'est orienté vers l'optimisation de deux techniques d'extraction « écologique » permettant l'extraction de composés phénoliques de la fleur d'*Opuntia ficus barbarica*.

L'amélioration de l'extraction des composés phénoliques de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* est étudiée par deux nouvelles techniques d'extractions pour préparer un extrait hydroéthanolique par extraction assistée par ultrasons (UAE, Ultrasonic Assisted Extraction) et extrait aqueux par extraction assistée par microonde (MAE, Microwave Assisted Extraction)

### **II.4.1. Extraction hydroéthanolique assistée par ultrasons (UAHE, Ultrasonic Assisted hydroethanolic Extraction)**

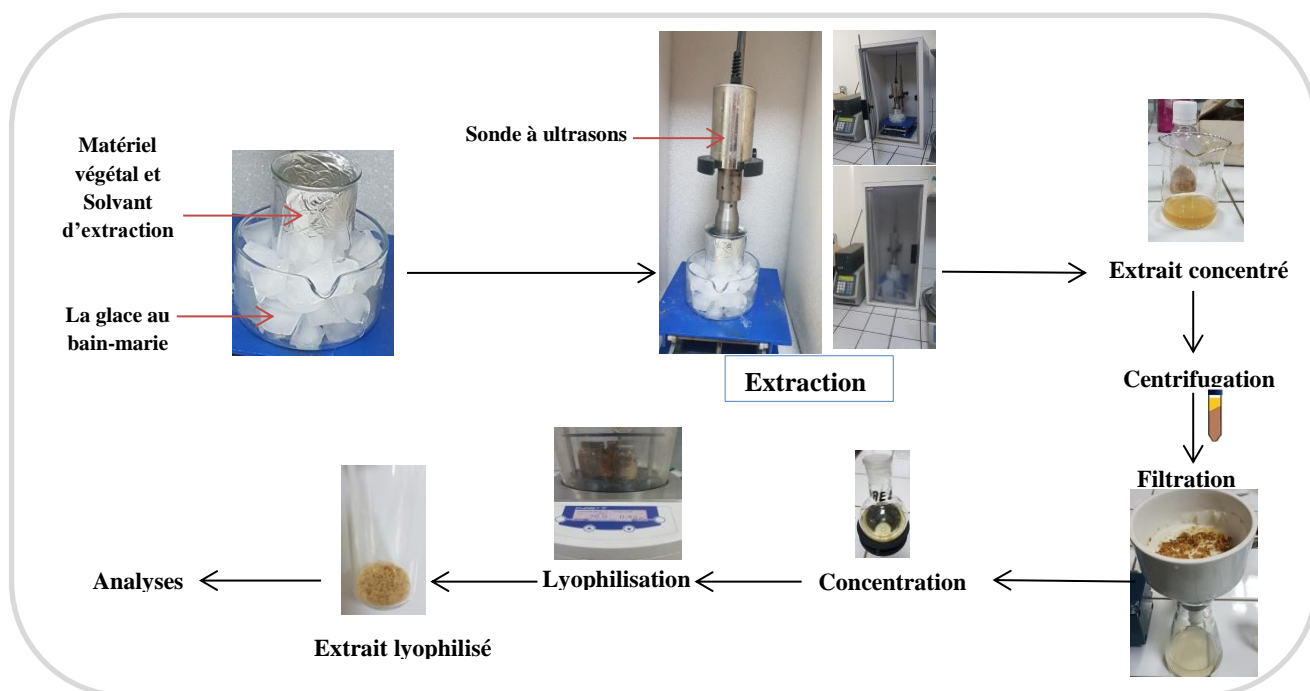
#### **II.4.1.1. Principe de l'extraction UAHE**

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* par ultrasons est fait par l'eau pure ou contenant de l'éthanol ou éthanol pure, La concentration d'éthanol en eau est un facteur important dans le solvant de l'extraction, mais la quantité d'éthanol est également importante pour augmenter la solubilisation des composés phénoliques. Trois variables indépendantes sont étudiées : le rapport liquide/solide, la concentration en éthanol et le temps d'extraction. A l'intersection des deux principes de base, soit celui des ultrasons et celui des extractions, il est possible de considérer l'interaction possible des ondes ultrasoniques sur les performances d'extraction de composés organiques présents dans les plantes. Tel que les ultrasons possèdent plusieurs avantages dont celui de briser les parois cellulaires des organismes végétaux ainsi que celle de provoquer des effets de capillarité dans la matière végétale [78].

#### **II.4.1.2. Procédure d'extraction**

La procédure d'extraction assistée par ultrasons a été réalisée dans un appareil à ultrasons (Bioblock Scientific, 75115 Vibra-Cell Ultrasonic, USA) de puissance constante de 400 W à une fréquence de 40 kHz. Le matériau échantillon (1 g), sous forme de poudre, a été mélangé avec le volume approprié de solvant. Les variables contrôlées et les plages testées étaient les suivantes : rapport liquide/solide ( $X_1$  : de 20 à 100 mL), concentration de l'éthanol dans l'eau ( $X_2$  : de 0 à 100%) et durée ( $X_3$  : de 15 à 45 min). La température d'extraction a été maintenue en dessous de 30 à 35 °C en utilisant de la glace au bain-marie [113]. Les mélanges ont été centrifugés et les différents surnageants ont été évaporés à 40°C sous pression réduite

(Laborota 4003-control, Heidolph, Allemagne), lyophilisés et stockés à -20 °C avant l'analyse.



**Figure II-1 : Illustration schématique de la procédure d'extraction UAHE dans cette étude.**

#### II.4.1.3. Optimisation de l'UAHE par plan d'expériences

Nous avons adopté une optimisation par plan d'expériences pour développer la technique d'extraction assistée par ultrasons. Des expériences préliminaires ont été effectuées pour déterminer les paramètres influant et délimiter le domaine d'étude du plan d'expériences.

##### II.4.1.3.1. Principe du plan d'expériences

L'approche des plans d'expériences, basée sur l'élaboration d'une série de tests expérimentaux, consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un à plusieurs facteurs à chaque essai. Par rapport à une optimisation classique qui peut conduire à un nombre considérable d'expériences, cette méthodologie va permettre de diminuer le nombre d'expériences à réaliser, tout en augmentant le nombre de renseignements obtenus sans altérer la qualité des résultats. Outre l'influence de chaque facteur, il est possible d'obtenir des informations sur les interactions entre facteurs étudiés, et sur les paramètres optimaux par rapport à une réponse qui est une grandeur caractéristique de l'étude réalisé [114].

#### **II.4.1.3.2. Paramètres expérimentaux du plan d'expériences (facteurs)**

Dans notre étude, les paramètres expérimentaux qui seront pris en compte dans l'optimisation de l'extraction assistée par ultrason sont le rapport liquide/solide (20:1-100:1 mL/g), concentration de l'éthanol dans l'eau (0-100%) et le temps d'extraction (15-45 min).

#### **II.4.1.3.3. Evaluation de la quantité extraite (réponse)**

La réponse habituelle pour optimiser une technique d'extraction, est le rendement d'extraction qui estime la masse de molécules extraites par rapport au matériel de départ. Pourtant, l'objectif de notre étude est de développer une méthode d'extraction verte qui permette d'obtenir un extrait plus riche que possible en composés phénoliques. Dans notre étude, l'extraction à de faibles valeurs de temps a mené à de très faibles quantités extraites ce qui rend l'estimation du rendement d'extraction, et ce de manière répétable, difficile. Donc nous avons caractérisés la qualité de chaque extrait par le dosage de la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes et par une évaluation de l'activité antioxydante. Une estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content) de chaque extrait a été obtenue par le test colorimétrique Folin-Ciocalteu (FC). Le contenu en flavonoïdes totaux (TFC, Total Flavonoid Content) a également été réalisé par le test colorimétrique du trichlorure d'aluminium. La capacité antioxydante a été évalué via deux tests chimiques : la méthode utilisant le radical 2,2- diphenyle-1-picrylhydrazyle (DPPH') et la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power).

#### **II.4.1.3.4. Modélisation du plan d'expériences**

Dans le présent travail, nous avons étudié les effets des paramètres suivants : rapport liquide/ solide (20: 1-100: 1 mL / g), concentration d'éthanol dans l'eau (0-100%) et temps d'extraction (15-45 min). Méthodologie de surface de réponse (RSM, Response Surface Methodology) a été appliquée pour optimiser les conditions d'extraction. En outre, la conception Box-Behnken (BBD) a été utilisée pour déterminer les conditions optimales pour l'extraction hydroéthanolique assistée par ultrasons (UAHE). Le tableau II-1 présente les variables indépendantes avec leurs niveaux et facteurs codés respectifs. La matrice de conception complète de BBD, composée de 17 combinaisons d'expériences différentes, comprenant cinq répétitions de points centraux, a été analysée à l'aide du logiciel JMP 10.0 pour l'analyse statistique (variance, régression coefficients et équation de régression). Les données expérimentales de chaque réponse ont été intégrées dans un modèle polynomial du second ordre, comme illustré dans l'équation (1) :



$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (1)$$

Où Y est la variable de réponse prévue ;  $\beta_0$  est l'interception ;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  sont les coefficients linéaires de  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  et  $\beta_{33}$  sont les coefficients carrés de  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ , et  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  et  $\beta_{23}$  sont les coefficients d'interaction de  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ . Toutes les mesures ont été répliquées trois fois et les résultats expérimentaux ont été exprimés en tant que moyennes.

**Tableau II-1 : Matrice expérimentale du plan d'expériences en utilisant Box Behnken Design pour les trois facteurs étudiés : rapport liquide/solide (20: 1-100: 1 mL / g), concentration d'éthanol dans l'eau (0-100%) et temps d'extraction (15-45 min). Les niveaux -1, 0 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur, le centre, et le niveau supérieur du domaine d'étude.**

Ordre expérimental	Conditions d'extractions					
	Code de variables			Variables décodées		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Rapport liquide/solide (mL/g)	Concentration d'éthanol (%)	Temps (min)
1	-1	-1	0	20	0	30
2	-1	1	0	20	100	30
3	1	-1	0	100	0	30
4	1	1	0	100	100	30
5	0	-1	-1	60	0	15
6	0	-1	1	60	0	45
7	0	1	-1	60	100	15
8	0	1	1	60	100	45
9	-1	0	-1	20	50	15
10	1	0	-1	100	50	15
11	-1	0	1	20	50	45
12	1	0	1	100	50	45
13	0	0	0	60	50	30
14	0	0	0	60	50	30
15	0	0	0	60	50	30
16	0	0	0	60	50	30
17	0	0	0	60	50	30

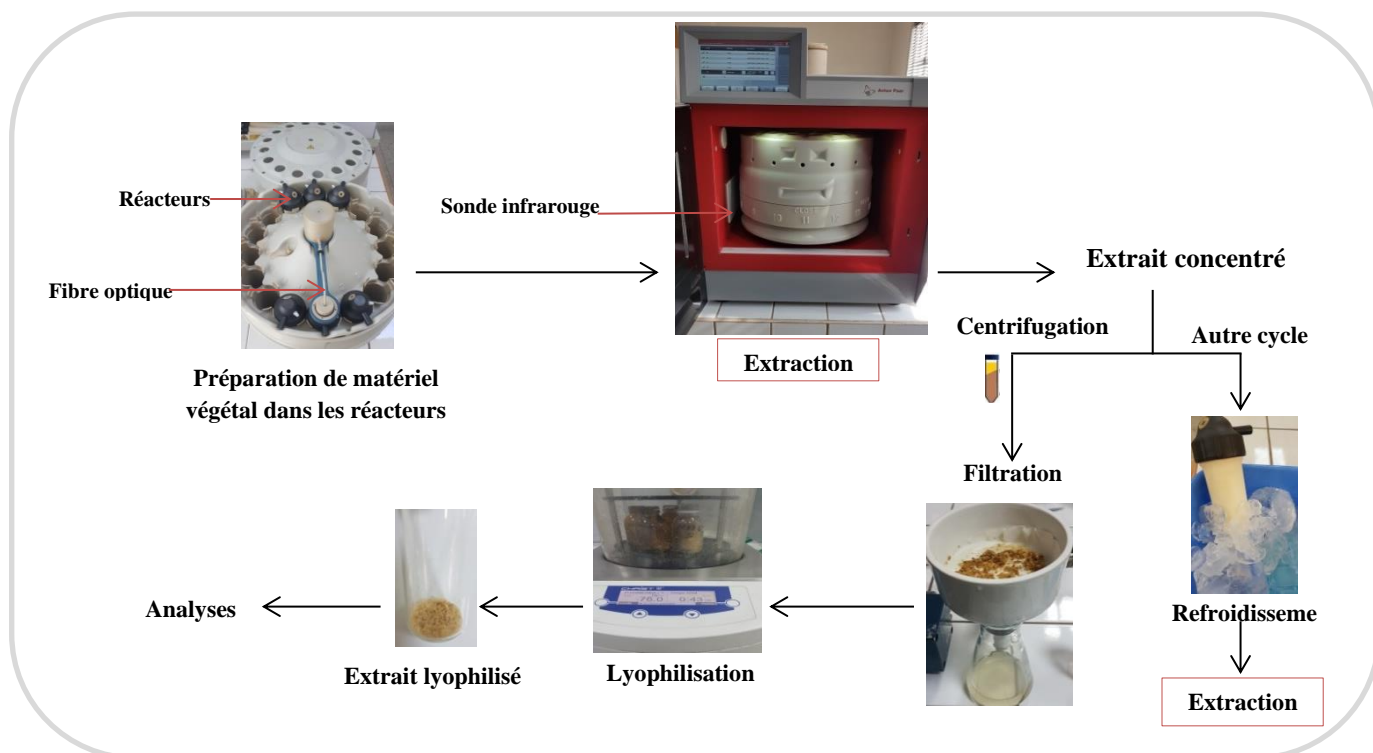
## **II.4.2. Extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE, Microwave Assisted aqueous Extraction)**

### **II.4.2.1. Principe de l'extraction MAAE**

MAAE consiste à préparer un extrait aqueux sous pression et sans solvant organique. Le mélange : matériel végétal/eau est placé directement dans le réacteur puis est soumis à l'irradiation microondes. Ce traitement accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales. Au cours du traitement, le chauffage provoque la rupture des liaisons hydrogène faibles par la rotation dipolaire des molécules. Une quantité considérable de pression s'accumule à l'intérieur du biomatériau, qui modifie les propriétés physiques des tissus biologiques et améliore la porosité de la matrice biologique. Ceci permet une meilleure pénétration du solvant d'extraction à travers la matrice et facilite l'extraction des composés bioactifs [83].

### **II.4.2.2. Procédure d'extraction**

La procédure d'extraction assistée par microonde a été réalisée dans un système d'extraction microondes modulaire Multiwave 3000 (Anton Paar GmbH, Graz, Autriche), adapté à des températures et des pressions élevées, dans lequel est introduit le réacteur d'une capacité de 50 mL. Le logiciel easyCONTROL permet de piloter et de contrôler les différents paramètres que sont le temps d'irradiation, la puissance micro-ondes et la température. Cette dernière peut être enregistrée à l'intérieur et à l'extérieur du réacteur grâce à une fibre optique ATC-FO introduite directement dans le récipient et à une sonde infrarouge placée sur les parois du four.



**Figure II-2 : Illustration schématique de la procédure d'extraction MAAE développée pendant cette étude.**

A partir des tests préliminaires il a pu être déterminé un protocole expérimental dont les différentes étapes, décrites dans la figure 17, comprennent :

- l'introduction de mélange (matière végétale/eau) dans le réacteur fermé
- l'irradiation micro-onde à une puissance et un temps donné
- le transfert de l'extrait dans un tube à centrifuger
- la centrifugation à 4000 tours/min pendant 10 min.
- la filtration sur un filtre à membrane de 0,45  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel, Chromafil RC-45/25, Allemagne), les différents filtrats ont été lyophilisés (Martin Christ Alpha 1-2 LD plus, Allemagne) et stockés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  avant l'analyse.

Dans le cas de plusieurs cycles d'extraction, le réacteur est refroidi dans un bain de glace jusqu'à ce que la température soit revenue à son niveau initial ( $20\text{ à }25^{\circ}\text{C}$ ). Les différents paramètres optimisés pendant cette étude ont été la ration liquide/solide ( $20\text{ mL/g}$  à  $50\text{ mL/g}$ ), la puissance d'irradiation ( $200\text{ à }700\text{ W}$ ) et le nombre de cycles ( $1\text{ à }5$ ). Les extraits obtenus ont ensuite été lyophilisés et stockés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  avant l'analyse.

### **II.4.2.3. Optimisation de l'MAAE par plan d'expériences**

Nous avons adopté une optimisation par plan d'expériences pour développer l'extraction aqueuse des composés antioxydants de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*. Des expériences préliminaires ont été effectuées pour déterminer les paramètres influant et délimiter le domaine d'étude du plan d'expériences.

#### **II.4.2.3.1. Paramètres expérimentaux du plan d'expériences (facteurs)**

Dans cette étude, les paramètres expérimentaux qui seront pris en compte dans l'optimisation sont le rapport liquide/solide (mL/g), la puissance d'irradiation microondes (W) et le nombre de cycles d'extraction. La gamme de puissance disponible sur l'appareil microondes dont nous disposons : 200-700W. Le nombre de cycles d'extraction a été limité à cinq cycles au maximum afin d'obtenir un temps d'extraction total n'excédant pas 30 min. Chaque cycle d'extraction nécessite une étape de refroidissement de 5 min dans la glace. La durée d'irradiation a été choisie en fonction de la température et de la pression à l'intérieur du réacteur. Un temps d'irradiation de plus d'une minute a induit des surpressions à l'intérieur du réacteur, conduisant à l'ouverture de la membrane de sécurité de ce dernier et par conséquent à une perte de matière. Afin de prévenir toute surpression, le temps d'irradiation a été limité à 1 min. La masse de matière végétale à extraire a été fixée à 1 g pour être compatible avec le volume du réacteur et pour assurer une bonne homogénéité des échantillons à extraire.

#### **II.4.2.3.2. Evaluation de la quantité extraite (réponse)**

L'objectif de notre étude est de développer une extraction aqueuse qui permette d'obtenir un extrait vert (sans solvant organique) et le plus riche possible en composés phénoliques.

Nous avons caractérisé la qualité de chaque extrait par le rendement d'extraction, la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes présents. Une estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content) de chaque extrait a été obtenue par le test colorimétrique Folin-Ciocalteu et de la teneur en flavonoïdes par analyse HPLC (partie II.6). Chaque extrait sera ainsi caractérisé par trois réponses différentes.

#### **II.4.2.3.3. Modélisation du plan d'expériences**

La méthodologie de surface de réponse (RSM) a été appliquée pour obtenir les conditions optimales pour l'extraction maximale des composés phénoliques et de la teneur en flavonoïdes. Le BBD a été utilisé pour déterminer les conditions optimales de MAAE. Les

trois variables indépendantes de la ration solide/liquide (g/mL, X1), de la puissance d'extraction (W, X2) et du nombre de cycle (n, X3) à trois niveaux (-1, 0, +1) ont été étudiées.

Les valeurs codées et décodées des variables indépendantes et leurs niveaux sont présentés dans le tableau II-2. Un total de 17 combinaisons d'expériences différentes, dont cinq répétitions des points centraux, ont été analysées à l'aide du logiciel JMP 10.0 pour l'analyse statistique de la variance, la régression coefficients et équation de régression.

**Tableau II-2 : Matrice expérimentale du plan d'expériences en utilisant Box Behnken Design pour les trois facteurs étudiés : rapport liquide/solide, puissance d'irradiation micro-ondes, et nombre de cycles. Les niveaux -1, 0 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur, le centre, et le niveau supérieur du domaine d'étude.**

Ordre expérimental	Conditions d'extractions					
	Code de variables			Variables décodées		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Rapport liquide/solide (mL/g)	Puissance (W)	Nombres de cycles
1	-1	-1	0	20	200	3
2	-1	1	0	20	700	3
3	1	-1	0	50	200	3
4	1	1	0	50	700	3
5	0	-1	-1	35	200	1
6	0	-1	1	35	200	5
7	0	1	-1	35	700	1
8	0	1	1	35	700	5
9	-1	0	-1	20	450	1
10	1	0	-1	50	450	1
11	-1	0	1	20	450	5
12	1	0	1	50	450	5
13	0	0	0	35	450	3
14	0	0	0	35	450	3
15	0	0	0	35	450	3
16	0	0	0	35	450	3
17	0	0	0	35	450	3

Le modèle polynomial du second ordre a été ajusté à chaque réponse, donnant une équation (2) en termes de facteurs de code, comme suit :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (2)$$

Où Y est la variable de réponse prévue ;  $\beta_0$  est l'interception ;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  sont les coefficients linéaires de  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  et  $\beta_{33}$  sont les coefficients carrés de  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ , et  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  et  $\beta_{23}$  sont les coefficients d'interaction de  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ . Toutes les mesures ont été répliquées trois fois et les résultats expérimentaux ont été exprimés en tant que moyennes.

## II.5. Analyses des extraits

### II.5.1. Rendement

Après lyophilisation, le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Rdt (\%)} = (\text{Mlyoph} / \text{Mg}) \times 100$$

Avec :  $M_{\text{lyoph}}$  = masse du lyophilisat ;  $M_g$  = masse de la plante.

La masse du lyophilisat (extrait sec) est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après lyophilisation) et le poids du ballon vide.

### II.5.2. Détermination de la teneur en polyphénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)

La détermination de la TPC dans les extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*) a été effectué par spectre photométrique selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu, basé sur la réduction d'un complexe jaune de molybdotungstane par les composés phénoliques donnant une coloration bleu au produit de la réaction [115].

#### **Mode opératoire :**

Préparation de l'extrait : 0,3g du lyophilisat a été dissous dans 10 ml de méthanol/eau distillée (70/30). Le mélange est laissé sous agitation magnétique pendant 20 min à température ambiante. La solution obtenue est ensuite filtrée.

Dosage : La teneur en phénols totaux (TPC) des extraits tels que préparés a été déterminée en utilisant la micro-méthode de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2003). En bref, 20  $\mu\text{L}$  de chaque extrait (préparé dans le méthanol avec les dilutions convenables) a été mélangés avec 1,58 mL d'eau ultra pure. Ensuite, 100  $\mu\text{L}$  de réactif Folin-Ciocalteu a été ajouté et bien mélangé. Après une période de temps allant de 30 s à 8 min, 300  $\mu\text{L}$  d'une solution de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 20% ont été ajoutés et bien agités. Le mélange est incubé immédiatement dans l'obscurité à 40 °C pendant 30 min. L'absorbance est lue à 760 nm contre une solution de méthanol utilisé comme blanc.

Le taux de polyphénols totaux dans nos extraits, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = a x + b$ ), établie avec des concentrations précises d'acide gallique (0-50 µg/mL), comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de l'extrait (mg EAG/g d'extrait).

### **II.5.3. Détermination de la teneur en flavonoïdes (TFC, Total Flavonoid Content)**

La méthode du trichlorure d'aluminium [116] est employée pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux dans les différents extraits des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*.

#### **Mode opératoire :**

1 mL de l'échantillon (préparé dans le méthanol avec les dilutions convenables) est ajouté à 1 mL de la solution d' $AlCl_3$  (2% dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage ( $y = a x + b$ ) établie par la rutine (0-40 µg/mL), réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons, servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de rutine par gramme de l'extrait (mg ER/g d'extrait).

### **II.5.4. Estimation de la teneur en polysaccharides**

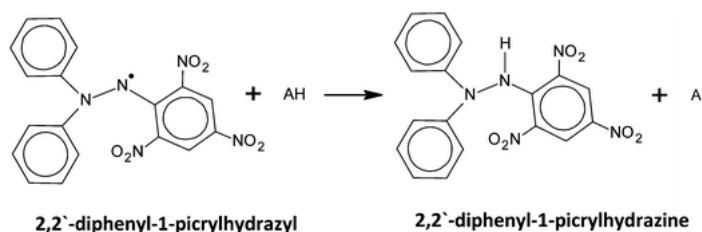
1 g du lyophilisat a été dissous dans 20 mL d'eau distillée et chauffé pendant 20 min à 60 °C. La solution obtenue est ensuite précipitée une nuit à 4 °C par addition d'éthanol (quatre fois le volume de la solution d'extrait), suivie d'une centrifugation à 4000 tours/min pendant 30 min. Après centrifugation, le précipité a été lavé avec de l'éthanol anhydre, puis dissout dans de l'eau distillée et lyophilisé. Le rendement d'extraction du polysaccharide a été mesuré en employant la méthode phénol-acide sulfurique [110] en utilisant le D-glucose en tant que standard. Tous les tests ont été effectués en double et la teneur en polysaccharide de l'extrait a été exprimée en mg/g de poids sec de lyophilisat.

### **II.5.5. Détermination de l'activité antioxydante par des tests chimiques *in vitro***

La capacité antioxydante des extraits bruts et des fractions a été évaluée à différentes concentrations.

### II.5.5.1. Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle)

En présence des piègeurs de radicaux libres (AH), le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune [117].



**Figure II-3 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH<sup>•</sup> entre l'espèce radicalaire DPPH<sup>•</sup>**

La capacité anti-radicalaire (DPPH) des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* ont été déterminées selon la méthode de Blois [118] avec de légères modifications. 500  $\mu$ L de chaque extrait à différentes concentrations ont été ajoutés à 375  $\mu$ L de méthanol et 125  $\mu$ L de solution de DPPH<sup>•</sup> (0,2 mM dans du méthanol) en tant que source de radicaux libres. Les mélanges ont été incubés pendant 60 min à température ambiante dans des conditions obscures.

#### **Mode opératoire :**

La capacité de balayage a été mesurée par spectrophotométrie en surveillant la diminution de l'absorbance. Dans sa forme radicalaire, le DPPH<sup>•</sup> possède une bande d'absorption à 517 nm, mais lors d'une réduction par un composé anti-radicalaire, son absorption diminue. L'absorbance inférieure du mélange réactionnel indiquait une activité plus élevée. Trolox a été utilisé comme contrôle positif. L'activité piégeant les radicaux du DPPH<sup>•</sup> a été calculée comme suit :

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = \frac{A_{\text{DPPH}^{\bullet}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

Où  $A_{\text{DPPH}}$  est l'absorbance de la solution de DPPH et  $A_{\text{sample}}$  est l'absorbance des échantillons d'extraits de fleurs.

La capacité antioxydante de Trolox Equivalent (A), utilisée pour quantifier et comparer l'activité des extraits, a été calculée à l'aide de la formule suivante :



$$A = \frac{EC_{50} Trolox}{EC_{50} Extrait}$$

De plus, l'activité antioxydante a été exprimée en  $\mu\text{mol}$  équivalents Trolox par g d'extrait sec de fleurs séchées ( $\mu\text{mol ET/g}$  d'extrait). Les courbes de Trolox et de chaque extrait ont été obtenues en traçant la concentration ( $\text{mg/mL}$  pour les extraits ;  $\mu\text{M}$  pour Trolox) en fonction de l'activité piégeuse des radicaux de la DPPH $\cdot$ . La concentration correspondant à 50% de DPPH $\cdot$  piégeant les radicaux ( $EC_{50}$ ) a été extrapolée à partir des différentes courbes.

### II.5.5.2. Pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)

Le pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) a été déterminé selon la méthode d'Oyaizu [119]. Cette méthode est basée sur la réaction de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en  $\text{Fe}^{2+}$ , la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en couleur bleu vert du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

#### Mode opératoire :

0,5 mL d'échantillons à différentes concentrations ont été mélangés à 0,5 mL de tampon au phosphate de sodium (0,2 M, pH 6,6) et à 0,5 mL de ferricyanure de potassium à 1% (III), puis incubés à 50 °C pendant 20 min. Après cela, 0,5 mL d'acide trichloroacétique à 10%, 0,5 mL d'eau distillée et 0,1 mL de chlorure ferrique ont été ajoutés et le mélange a été incubé pendant 10 min à 50 °C. L'absorbance a été mesurée à 700 nm par rapport à un blanc d'eau distillée. Trolox a été utilisé comme antioxydant standard. Les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{mol}$  équivalents Trolox par g d'extrait de fleur séchée ( $\mu\text{mol ET/g}$  d'extrait).

### II.5.5.3. Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène

L'activité antioxydante des extraits a été réalisée par dosage de  $\beta$ -carotène-acide linoléique comme décrit par Koleva et al. [120]. Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes et des hydroperoxydes conjugués. Ces radicaux vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé, ce qui entraîne la perte de ses doubles liaisons, et par conséquent la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant (extraits, témoins positif)

permet de neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc la prévention de l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène [121].

### **Mode opératoire**

Une solution de  $\beta$ -carotène a été préparée en dissolvant 0,5 mg de  $\beta$ -carotène dans 25  $\mu$ L d'acide linoléique. Ensuite, 200  $\mu$ L de Tween 40 et 1 mL de chloroforme ont été ajoutés. Le chloroforme a ensuite été évaporé et 100 mL d'eau distillée ont été ajoutés au mélange sous agitation vigoureuse. 2,5 mL d'émulsion fraîchement préparée ont été mélangés à 300  $\mu$ L d'extraits à différentes concentrations, puis incubés au bain-marie à 50 ° C pendant 2h. Du Trolox et de l'eau dé-ionisée ont été utilisés pour préparer l'étalon positif et le tube témoin, respectivement. L'absorbance a été mesurée à 470 nm immédiatement et après 2 h d'incubation. Les valeurs d'activité antioxydante (AA%) ont été calculées à l'aide de l'équation suivante :

$$AA\% = 1 - \frac{Ab_{0 \text{ Sample}} - Ab_{120 \text{ Sample}}}{Ab_{0 \text{ control}} - Ab_{120 \text{ control}}} \times 100$$

La concentration d'extrait fournissant 50% d'activité antioxydante (CE50) a été calculée par interpolation à partir du graphique du pourcentage d'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène par rapport à la concentration d'extrait.

## **II.6. Identification et quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes dans les extraits actifs de la fleur d'*Opuntia ficus barbarica***

Parmi les différentes techniques de séparation des polyphénols, l'HPLC et plus récemment, la UHPLC sont incontestablement les méthodes les plus répandues et les plus importantes pour séparer et quantifier des composés phénoliques distincts. Afin d'identifier les molécules présentes dans l'extrait de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* nous avons utilisé l'HPLC avec deux systèmes de détection : UV-vis et MS, car ce sont deux modes de détection combinés pour l'analyse des composés phénoliques et surtout ils fournissent des informations structurales sur les molécules étudiées.

### **II.6.1. Présentation des techniques utilisées : HPLC-UV et HPLC-MS/MS**

#### **II.6.1.1. HPLC-UV :**

La détection UV-vis est le mode de détection couplé à la chromatographie liquide qui est le plus utilisé pour détecter et identifier des produits naturels qui possédant un ou plusieurs chromophores. Les détecteurs UV-vis les plus couramment utilisés sont des détecteurs à

barrette de diodes (DAD, Diode Array Detector), qui permettent de suivre une analyse à une large gamme de longueurs d'ondes en même temps, et d'enregistrer les spectres d'absorption de chaque composé élué par la phase mobile [122]. Cette méthode de détection est rapide, sensible, reproductible et non destructive. Les composés phénoliques possédant au moins un chromophore, donc l'analyse par HPLC-DAD permet d'obtenir des informations structurales et ainsi de réaliser un premier criblage photochimique de l'extrait [123]. Les flavonoïdes ont un spectre d'absorption spécifique avec deux bandes caractéristiques dans l'UV-Vis, une bande I qui absorbe entre 300 et 550 nm (noyau B) et une bande II qui absorbe entre 240 et 285 nm (noyau A) [41]. Les différentes classes de flavonoïdes sont reconnaissables à leur spectre UV. Les bandes seront plus ou moins intenses selon le nombre de doubles liaisons conjuguées sur la structure des flavonoïdes.

### II.6.1.2. HPLC-MS

La spectrométrie de masse est une technique de caractérisation chimique qui consiste à mesurer les rapports masse/charge ( $m/z$ ) des molécules présents dans un échantillon donné afin d'identifier leur structure chimique [124].

Le spectromètre de masse se décompose en quatre parties :

- L'analyseur qui consiste à séparer les ions formés en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).
- Une source d'ionisation qui consiste à vaporiser les molécules et les ioniser. Elle peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs.
- Un détecteur qui détecte un courant électrique relatif à la masse d'ions reçus aux différentes valeurs de  $m/z$ .
- Un système de traitement de données qui transforme le courant électrique en un signal chromatographique

Le type de source d'ionisation par électrospray (ESI, Electrospray Ionisation) est généralement le plus utilisé pour l'analyse des composés phénoliques par HPLC-MS [125,126].

L'ESI est la méthode d'ionisation la plus douce, où elle maintient les interactions non covalentes d'une macromolécule dans leur phase gazeuse. Il est également appelé pulvérisation ionique, pulvérisation sonique ou nanospray. L'échantillon est passé à travers un

capillaire électrique étroit à potentiel élevé résultant en une pulvérisation électrostatique composée de plusieurs gouttelettes chargées (positif ou négatif). De plus, ces gouttelettes passent sous un capillaire chauffé où le solvant s'évapore et explose en microgouttelettes, où les analytes ionisés chargés sont séparés des microgouttes qui s'échappent vers l'analyseur. L'avantage majeur des techniques d'ESI est que les ions acquièrent de multiples charges en fonction de leur masse moléculaire et donc les molécules sont successivement protonées résultant en de multiples spectres de pic en raison de différents rapports m/z. Il est utile pour déterminer la masse moléculaire dans des spectromètres à basse résolution. La sensibilité à l'ESI est appauvrie par des sources ESI miniaturisées, ce qui permet de réduire la taille de l'ouverture capillaire et de minimiser le débit [127].

## **II.6.2. Identification et quantification des molécules présentes dans l'extrait UAHE**

### **II.6.2.1. Conditions opératoires des paramètres d'ionisation**

#### **II.6.2.1.1. Conditions chromatographiques**

Les extraits de fleur ont été re-dissous dans du méthanol à 5 mg / mL et filtré à travers un filtre à membrane de 0,45 µm (Macherey-Nagel, Chromafil RC-45/25, Allemagne) pour l'injection.

La solution d'extrait d'échantillon a été analysée par le système UHPLC Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) équipé d'une détection à barrette de diodes (DAD), d'un détecteur (Ultimate 3000 RS à longueur d'onde variable) et d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) (Thermo Scientific Orbitrap ID-X Tribrid Mass Spectrometer System). La séparation des composés phénoliques a été réalisée en utilisant la colonne Acclaim Polar Advantage (phase inverse C18, diamètre interne 4,6, longueur 250 mm, granulométrie 5 µm).

Le volume d'injection était de 10 µL et la température de la colonne était réglée à 25 °C. Le DAD a été réalisé en ligne dans les spectres UV-Vis dans la gamme de 220-380 nm. L'ionisation par électrospray (ESI-MS) a été effectuée à une tension de fragmentation de 100 V, à un débit de 1 mL/min. L'analyse a été réalisée en utilisant des modes d'ions négatifs avec des spectres acquis dans la plage de m/z 100-1000. La phase mobile était une solution aqueuse d'acide acétique à 2,5% (solvant A) et d'acétonitrile pur (solvant B). La séparation a été effectuée en utilisant le gradient en plusieurs étapes suivant : 0-5 min, 9% B ; 5-15 min 16% B ; 15-45 min 50% B et enfin un cycle de conditionnement de 5 min est effectué avant la prochaine analyse. Les données UV et MS ont été acquises et traitées à l'aide du logiciel

thermo Xcalibre (version 4.0.27.42, Thermo Fisher Scientific Inc). Les composés identifiés ont été caractérisés en interprétant leur ordre d'élution dans les chromatogrammes HPLC, leurs spectres UV-vis, leurs spectres de masse et ont été comparés avec les standards correspondants en tenant compte des informations disponibles dans la littérature. La courbe d'étalonnage des étalons externes a été obtenue à une concentration comprise entre 0,01 et 0,5 mg / mL, par rapport à la zone obtenue à partir de l'intégration des pics PDA à 280 nm pour l'acide phénolique en utilisant le coefficient d'extinction de l'acide gallique et à 363 nm pour le flavonoïde en utilisant l'extinction coefficient de quercétine-3-O-rutinoside. La quantité de chaque composé est exprimée en mg par g d'extrait.

**Tableau II-3 : Conditions du gradient d'analyse HPLC**

Temps (min)	% solvant A		% Solvant B
	H <sub>2</sub> O	2,5% CH <sub>3</sub> COOH	Acétonitrile pur
0	91		9
5	91		9
6	84		16
15	84		16
16	50		50
45	50		50
55	50		50

#### II.6.2.1.2. Fragmentation des flavonoïdes-O-glycosylés

Le mode négatif est plus utilisé pour l'identification structurale par HPLC-MS des flavonoïdes car il est plus sélectif et plus sensible [124,128]. La structure des flavonoïdes-O-glycosylés peut subir à la fois un clivage hétérolytique et homolytique permettant de déterminer la nature du sucre et sa position sur l'aglycones [128,129].

La nature et la position de la substitution de sucre ont également affecté le clivage induit par collision de la liaison O-glycosidique. Le clivage hétérolytique de la liaison O-glycosidique produit l'ion fragment  $[Y_0]^{\pm}$  de l'aglycone qui permettent de déterminer facilement la nature de celui-ci. Le clivage homolytique de liaisons O-glycosidiques produit l'ion radicalaire de l'aglycone  $[Y_0 - H]^{\pm}$ . Pour les flavonols, ils ont démontré que la proportion relative de  $[Y_0 - H]^{-}$  augmentait avec le nombre de groupements hydroxyles sur le noyau B, et que la nature et la position des sucres sur l'aglycone avait une influence sur la formation de cet ion radicalaire. Une glycosylation en position 7 conduit à une proportion plus importante de  $[Y_0 - H]^{-}$  par rapport à une glycosylation en position 3 [128–130].

## **II.6.3. Quantification des flavonoïdes présents dans les extraits et fractions**

### **II.6.3.1. Conditions chromatographiques**

Un échantillon de 50 mg de l'extrait de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* lyophilisé a été dilué avec du 10 mL de méthanol. La solution diluée a été analysée quantitativement pour la teneur en flavonoïdes par chromatographe HPLC en utilisant un détecteur UV-Visible à 366 nm et une colonne en phase inversée C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) fonctionnant à 37 ° C. La phase mobile comprenait deux solvants : l'eau ultra pure acidifiée par 2,5% d'acide acétique (A) et l'acétonitrile pure (B). Le gradient linéaire du solvant dans les rapports volumiques a été calculé comme suit : 0-5 min : 9% B ; 5-15 min : 16% B ; 15-45 min : 50% B, le gradient de solvant étant ensuite maintenu à 50% B pendant 5 min. Le débit était de 1 mL/min et le volume d'injection était de 10 µL. L'identification des flavonoïdes était basée sur les temps de rétention par rapport à la norme (Sigma-Aldrich, Allemagne) et leur spectre UV-vis. L'analyse a été effectuée au moins trois fois et seules les valeurs moyennes ont été rapportées. La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir de la zone de pic selon la courbe d'étalonnage en utilisant la méthode standard externe et exprimée en mg/g d'extrait.

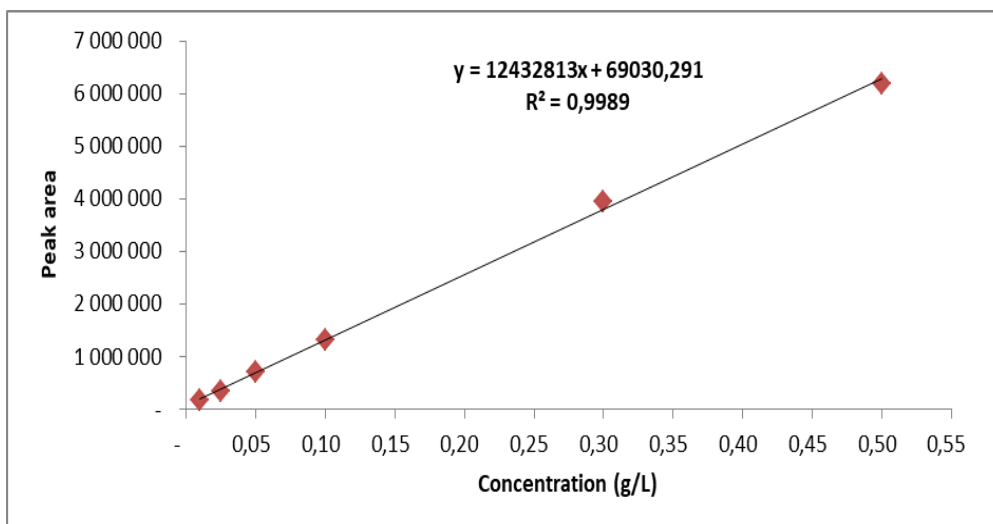
### **II.6.3.2. Préparation de la solution standard de quercétine-3-O-rutinoside (rutine)**

Une certaine quantité d'étalon de quercétine-3-O-rutinoside (0,0052 g) a été pesée avec précision dans une fiole jaugée de 100 mL. L'étalon de quercétine-3-O-rutinoside a été dissous et dilué à volume constant avec du méthanol, et agité pour obtenir une solution mère de quercétine-3-O-rutinoside à 0,0520 g / L.

Une certaine quantité d'étalon de quercétine-3-O-rutinoside (50,1 mg) a été pesée avec précision dans une fiole jaugée de 50 mL. L'étalon de quercétine-3-O-rutinoside a été dissous et dilué à volume constant avec du méthanol, et agité pour obtenir une solution mère de quercétine-3-O-rutinoside à 1 g/L.

### **II.6.3.3. Courbe d'étalonnage**

Certaines quantités de la solution mère standard de quercétine-3-O-rutinoside (0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 5 mL) ont été pipetées dans des flacons volumétriques de 10 mL, respectivement, et diluées avec du méthanol anhydre à volume constant. Ensuite, 10µl de chaque solution ont été injectés et déterminés pour la surface de pic. Les résultats des tests ont montré que l'aire maximale de la quercétine-3-O-rutinoside A était en bonne relation linéaire avec la concentration C dans la plage de 0,01-0,5 g/L. L'équation de régression était  $y=12432813x+69030,291$ ,  $R^2 = 0,9989$ .



**Figure II-4 : Courbe d'étalonnage de la quercétine-3-O-rutinoside.**

#### **II.6.3.4. Calcul de la teneur des flavonoïdes totaux dans les extraits et les fractions.**

Après que l'extrait de la fleur a été analysé par HPLC, les principaux composants de l'extrait étaient l'isorhamnétine-rutinoside-rhamnoside, dérivés de l'isorhamnétine, quercétine-3-O-rutinoside, quercétine-3-O-galactoside, quercétine-3-O-Glucoside, kaempférol-3-O-rutinoside, isorhamnétine-glucoside-rhamnoside, isorhamnétine-3-O-rutinoside, isorhamnétine-3-O-Glucoside, isorhamnétine-3-O-galactoside et kaempférol-3-O-arabinoside, qui avaient les surfaces de pics 6-16, respectivement. Selon la courbe standard de la quercétine-3-O-rutinoside et le facteur de conversion moyen (1,05) et l'équation de régression, la teneur en glycosides flavonoïdes peut être obtenue, et la formule de calcul est donnée comme ci-dessous :

$$TFC = \frac{\sum \text{aire des pics} + 58808,955}{12288501} \times 1,05 \times \frac{50}{m_s}$$

Où, 12288501 est la pente de la courbe standard de la quercétine-3-O-rutinoside, 58808,955 est l'ordonnée à l'origine de la courbe standard de la quercétine-3-O-rutinoside, 50 est le volume de la solution d'échantillon (mL) et  $m_s$  est la masse de l'échantillon (g).

La conversion quercétine-3-O-rutinoside a été calculée comme suit :

$$\text{Conversion} = \frac{W}{c \times d}$$

où,  $w$  : est le poids du quercétine-3-O-rutinoside (mg),  $c$  : est l'équivalent de la concentration en quercétine-3-O-rutinoside (mg/mL), qui a été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage,  $d$  : est un facteur de dilution du quercétine-3-O-rutinoside.

## **II.7. Investigation photochimique et biologique de différents extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* par les méthodes statistiques descriptives**

La synthèse bibliographique entreprise au début de ce travail de thèse a permis de constater que les connaissances sur l'*Opuntia ficus-barbarica* se limitaient principalement à l'étude du pouvoir thérapeutique et du contenu phytochimique de ses fruits et de ses raquettes, les fleurs de l'*Opuntia ficus-barbarica* étant très peu étudiées. Par ailleurs, une demande croissante en ingrédients d'origine naturelle a été observée ces dernières années favorisant par conséquent la recherche de nouveaux composés bioactifs. Cette recherche peut prendre plusieurs formes et avoir plusieurs intérêts mais nous avons principalement trois objectifs et qui reviennent souvent dans la littérature

- Trouver de nouvelles molécules antioxydants et d'origine naturelle.
- Remplacer des ingrédients de synthèse, qui sont nocifs pour la santé humaine, par des ingrédients d'origine naturelle
- Développer des nouvelles méthodes d'extraction des molécules bioactives qui soient à la fois rapides, efficaces et plus respectueuses de l'environnement pour assurer une productivité des extraits antioxydants naturels et commercialisables.

Les données des différents dosages de composés phytochimiques et l'activité antioxydante ont été mises en relation avec la méthode d'extraction à travers l'usage du logiciel mathématique IBM SPSS statistics version 21.0. Une Analyse en Composante Principale (ACP) et Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) ont été effectuées dans le but d'établir la corrélation entre les différentes familles de composés dosées dans les extraits d'une part et entre ces composés et la méthode d'extraction d'autre part.

### **II.7.1. Analyse en Composante Principale (ACP)**

L'ACP est une méthode statistique qui permet d'analyser des données quantitatives dans un espace multidimensionnel. Le principe est basé sur un changement de variable qui réduit les dimensions d'une donnée multivariée en deux ou trois nouvelles variables appelées composantes principales qui fournit en conséquence une représentation graphique simplifiée de celui-ci et en conservant un maximum d'information. La méthode ACP est utilisée lorsque les données étudiées sont issues de l'observation de  $n$  individus situés dans un espace  $E$  de  $p$  dimensions ( $p > 3$ ), alors que l'ensemble des données forme un nuage de  $n$  points dans  $E_p$ .



### **II.7.2. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)**

La CAH est une méthode de classification semi-supervisée qui recherche à regrouper les individus dans des classes homogènes et les plus semblables possible entre elles. L'objectif de la CAH est de classer  $n$  individus ou observations ayant un comportement similaire sur un ensemble de  $p$  variables. Le regroupement entre individus se fait de manière hiérarchique, car les individus sont classés deux à deux des plus proches vers les plus éloignés. Il en résulte un dendrogramme (arbre) regroupant tous les individus selon leurs similitudes en un ensemble de classes. Le nombre de classes différentes est ensuite déterminé par l'expérimentateur à la vue du dendrogramme et en considérant l'écart entre les distances [131].

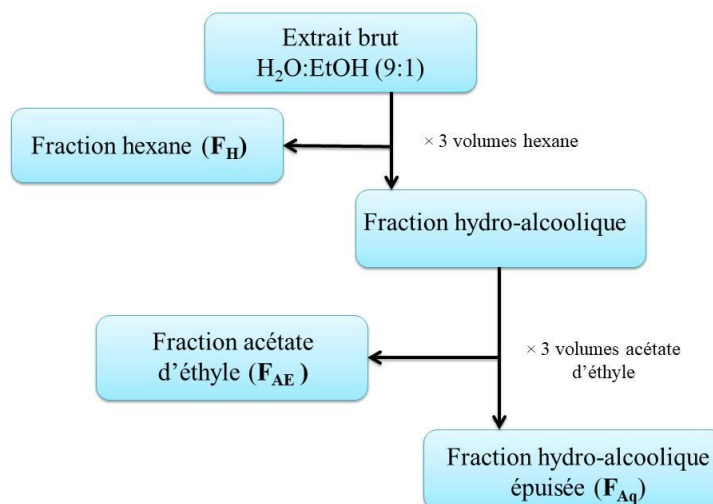
### **II.8. Bioactivité et investigation phytochimique des extraits UAHE et MAAE de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica***

Dans cette partie les objectifs de l'étude approfondie seront multiples :

- Fractionner les extraits bruts d'UAHE et MAAE
- Confirmer l'activité antimicrobienne des extraits bruts ainsi que de leurs fractions respectives sur des souches pathogènes de l'homme.
- Évaluer l'activité antioxydante des extraits bruts et des fractions
- Étudier la composition phytochimique des extraits bruts et des fractions

#### **II.8.1. Fractionnement des extraits bruts UAHE et MAAE par Extraction Liquide-Liquide (ELL)**

Dans le but de séparer les extraits bruts UAHE et MAAE de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* en fractions de polarités différentes nous avons opté pour un fractionnement ELL qui permet de partager les molécules selon leurs propriétés physico-chimiques entre deux phases liquides non miscibles. La méthodologie est résumée dans Figure II-5. Les extraits secs (100 mg de UAHE ou de MAAE dans 20 mL de solvant) ont été premièrement dissous dans un mélange H<sub>2</sub>O:EtOH (9:1) puis partagés successivement avec trois volumes d'hexane (H) et trois volumes d'acétate d'éthyle (AE) pour constituer respectivement une fraction apolaire dans l'hexane (F<sub>H</sub>) et une fraction moyennement polaire dans l'acétate d'éthyle (F<sub>AE</sub>). La solution hydro-alcoolique restant à la fin du partage a été utilisée comme fraction polaire (F<sub>aq</sub>).



**Figure II-5 : Schéma de fractionnement ELL adopté pour le partage en trois fractions ( $F_H$ ,  $F_{AE}$  et  $F_{Aq}$ ) de l'extrait brut UAHE et MAAE.**

## II.8.2. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des extraits bruts et ses fractions a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque qui repose sur le principe de l'antibiogramme.

### II.8.2.1. Les souches bactériennes testées

Pour ce travail, quatre souches ont été testées vis-à-vis les extraits bruts UAHE et MAAE et ses fractions, et des antibiotiques standards (Floxapen, Norfloxacin, Fosfomycin, Piperacillin tazobactam, Amoxicillin). Il s'agit de quatre souches bactériennes : deux grams négatives et deux grams positifs connus pour être responsables d'infections nosocomiales (Tableau II-4).

**Tableau II-4 : Liste des souches microbiennes testées**

Souche	Gram	Code
<i>Escherichia coli</i>	Négative	(CIP 54127)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négative	(CIP A22)
<i>Enterococcus sp.</i>	Positive	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	(CIP 53154)

### II.8.2.2. Préparation de l'inoculum

Une culture bactérienne de 24h a été préalablement ensemencée, par la suite, une culture sur bouillon nutritif a été préparée à partir de cette culture sur milieu gélosé. Après 18h d'incubation, les inoculums de  $10^5$ - $10^6$  UFC/mL ont été ajusté après dilution dans l'eau physiologique stérile.

### II.8.2.3. Préparation des concentrations des extrais bruts et fractions

Des dilutions en série successives ont été effectuées à partir de chaque extrait brute et fraction testée par progression géométrique de manière à obtenir les concentrations finales d'extrait brut et fraction présentée dans le tableau II-5.

**Tableau II-5 : Concentrations des extraits bruts (UAHE et MAAE) et ses fractions en  $\mu\text{g/mL}$**

Extraits	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )
Extrait brut	100
	400
	600
Fraction	50
	100
	200
	400

### II.8.2.4. Méthode de diffusion sur disque

Cette méthode a été réalisée par dépôt d'extraits bruts et fractions sur des disques de papier wattman de 6 mm de diamètre permettant une diffusion à l'intérieur.

Un volume de 1 mL de la suspension microbienne ajustée à  $10^6$  UFC/mL pour chaque souche bactérienne a été versé par inondation dans les boites de pétri contenant 15 mL de gélose nutritive. Après 10 min de contact, le surplus a été aspiré et éliminé. Les disques de papier imprégnés de 10  $\mu\text{L}$  d'extraits bruts et de ses fractions de concentration différentes ont été déposés à la surface des milieux de culture à raison de six disques par boite. Les disques d'antibiotique ont été également placés dans la boîte de pétri comme contrôle positif. En parallèle, des boites de pétri ensemencée par l'inoculum seul ont été prises comme le contrôle de la croissance des souches testées. Les boîtes de pétri ont été laissées à température ambiante pendant 1h pour la diffusion des extraits et incubées à l'étuve à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24h et 48h.

L'inhibition de la croissance bactérienne a été indiquée par l'obtention d'un halo clair autour des disques, elle a été mesurée en mm incluant le diamètre du disque.

La sensibilité est classée selon Ponce et al. [132] comme suit :

- Non sensible : Diamètre d'inhibition inférieur à 8 mm
- Sensible : Diamètre d'inhibition de 9-14 mm
- Très sensible : Diamètre d'inhibition de 15-19 mm
- Extrêmement sensible : Diamètre d'inhibition supérieur à 20 mm

### **II.8.3. Activité antioxydante**

L'activité antioxydante a été déterminée en utilisant les deux tests chimiques DPPH' et FRAP précédemment décrits (partie II-5). Les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{mol}$  d'équivalent Trolox par g d'extrait sec ( $\mu\text{mol ET/g}$  d'extrait), à partir des données d'absorbance et d'une droite d'étalonnage externe du Trolox réalisée entre 0,1 et 1 mg/mL.

### **II.8.4. Caractérisation phytochimique par HPLC : Identification des molécules présentes dans les fractions (F1-F3) des extraits UAHE et MAAE et détermination de la teneur en flavonoïdes**

### **II.8.5. Détermination de la teneur en composés phénoliques**

Le TPC, déjà décrits dans la partie II-5, a été effectuée en utilisant le reactif de Folin-Ciaocalteu. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait), par l'exploitation des données d'absorbance et la droite d'étalonnage d'acide gallique (0-50 $\mu\text{g/mL}$ ).

### **II.8.6. Détermination de la teneur en flavonoïdes**

La détermination de la teneur en flavonoïdes, déjà utilisée dans la partie II-6, a été analysée quantitativement par HPLC chromatographe. Un échantillon de 50 mg de l'extrait brute et 10 mg de l'extrait fraction de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* lyophilisé a été dilué avec 10 mL de méthanol. La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir de l'air de pic selon la courbe d'étalonnage en utilisant la méthode standard externe et exprimée en mg/g d'extrait.

## **II.9. Traitement statistique des données**

Les différentes expériences réalisées pendant ces travaux de thèse ont toutes été répétées au moins trois fois pour évaluer la répétabilité des procédures. Les résultats ont été analysés statistiquement et exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type en utilisant le logiciel SPSS (version 21.0). L'analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour des comparaisons multiples et la signification de la différence entre les traitements a été acceptée à  $p < 0,05$ . Le test de corrélation linéaire de Pearson a été utilisé pour déterminer les coefficients de corrélation ( $\rho$ ). Par ailleurs, ce logiciel a également été utilisé pour effectuer les tests statistiques multivariés tels que les ACP et CAH.

Le développement et l'analyse du plan d'expérience ont été réalisés avec le logiciel JMP (version 10.0).

### Chapitre III. Résultats et discussions

Ce chapitre présentera les résultats et discussion de l'ensemble des études effectuées sur les fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* et leurs extrais au cours de cette thèse.

#### III.1. Caractérisation physico-chimique de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*

Les résultats de la caractérisation physicochimiques de la poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* étudiée sont représentés dans le tableau suivant :

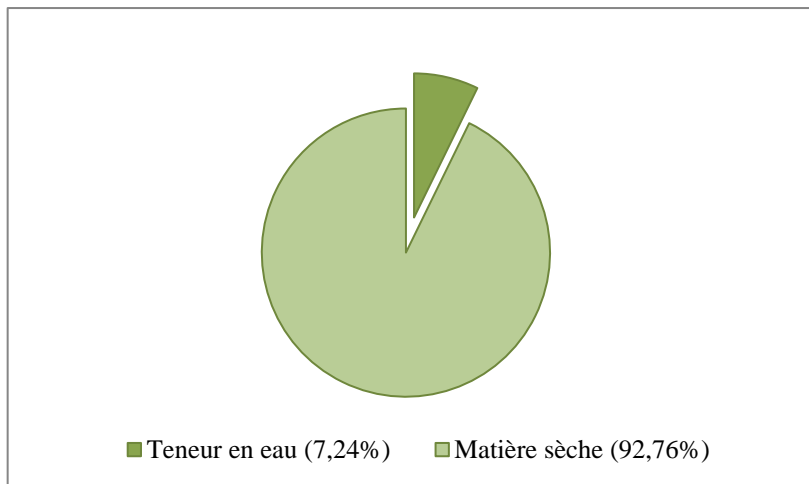
**Tableau III-1 : Paramètres physico-chimiques de la poudre des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*.**

Paramètres physicochimiques	Valeurs exprimées	
Humidité (%)	7,24 ± 0,04	
Cendre (%)	7,11±0,02	
pH	4,78 ± 0,02	
Activité d'eau (aw)	0,38 ± 0,004	
Lipide (%)	3,99 ± 0,2	
Sucre total (%)	6,75 ± 0,08	
Cellulose (%)	16,37 ± 0,70	
Protéines (%)	4,94 ± 0,22	
Pouvoir de gonflement	8,2 g d'eau/g de fleur sèche	
Capacité à retenir l'eau	8,36 g d'eau/g de fleur sèche	
Capacité à retenir de l'huile	1,8 g d'huile/g de fleur sèche	
Teneur des substances extractibles par l'eau (%)	31,64	
Teneur des substances extractibles par l'éthanol (%)	5,33	
Couleur	L*	74,00
	a*	4,46
	b*	62,79

### III.1.1. Le taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % [133]. Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau dans la poudre des fleurs sèches de notre plante. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

Les résultats de cette analyse ont révélé un taux d'humidité de  $7,24\% \pm 0,04$ , pour les fleurs de figuier de barbarie (*Opuntia ficus-barbarica*) (figure III-1). En se basant sur la constatation de Paris et Moysé [133] cité précédemment on peut déduire que cette fleur peut être conservé à long terme.



**Figure III-1 :** Teneur en humidité des fleurs sèches de figuier de barbarie d'*Opuntia ficus-barbarica*. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais

### III.1.2. Teneur en cendres

Les teneurs en cendres réalisées sur la matière première végétale ont donné une valeur de  $7,11 \pm 0,02$  %. La teneur résiduelle en cendre dans la matière première végétale constitue un indicateur de la teneur en éléments inorganiques. La valeur nutritionnelle et la qualité des aliments sont deux paramètres proportionnels à la teneur en cendres totales dans la plante. Une contamination de la matière première, avec du sable ou de la terre au moment de la récolte, ou un lavage insuffisant de la matière première, augmentant le taux de cendres. En effet, la pesée du résidu, uniquement constitué de matières minérales, permet d'évaluer le degré de propreté de la plante, ainsi que de déterminer les produits de fertilisant utilisés durant la culture. Certaines plantes, riches en minéraux présentent un taux de cendres naturellement élevé.

### III.1.3. pH

D'après les résultats obtenus, le pH de notre matière végétal est révélé être acide en moyenne de  $4,78 \pm 0,02$ . Ces résultats montrent que la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* est riche en acides organiques.

### III.1.4. Activité d'eau

L'activité de l'eau (tableau III-1) était de  $0,34 \pm 0,004$  pour la fleur sèche d'*Opuntia ficus-barbaric*, inférieur à celle rapportée par Sáenz et al [134] pour la poudre des cladodes d'*Opuntia* déshydratées. La faible valeur de l'activité de l'eau peut assurer une bonne stabilité microbienne et enzymatique pendant le stockage.

### III.1.5. Propriétés fonctionnelles

Les propriétés fonctionnelles des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* ont été étudiées en raison de leur importance par rapport à la fonctionnalité des produits alimentaires.

#### III.1.5.1. Pouvoir de gonflement

Notre résultat montre que la poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* présente une capacité de gonflement de 8,2 g d'eau / g de poids sec. Cette activité est attribuée à sa teneur en polysaccharides. En fait, ce résultat était similaire à ceux des farines obtenues à partir de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* et d'*Opuntia stricta* de 7,3 et 8,2 g d'eau/g de poids sec, respectivement[135]. Et à partir de cladodes déshydrates épineux et sans épines ( $\approx 7,5$  g / g poids sec) [136].

#### III.1.5.2. Pouvoir de rétention d'eau (PRE)

Le pouvoir de rétention d'eau (PRE)de la poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* (8,4 g d'eau / g de matière sèche) était supérieur à celui rapporté par Ammar [135] pour les fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* (5,7 g/g) et les fleurs d'*Opuntia stricta* (5,2 g/g) et par Saenz [134] pour les cladodes de cactus déshydratés (5,6 g/g). Cela peut être attribué aux différentes matières premières utilisées, à l'âge de la plante ou aux techniques analytiques appliquées dans cette étude. Plus le pouvoir d'absorption d'eau est élevé, plus l'effet de saturation de la consommation de d'eau par les fleurs est élevé. Ce PRE donne également des informations sur la teneur élevée en mucilage.



### III.1.5.3. Pouvoir de rétention d'huile (PRH)

Le pouvoir de rétention d'huile (PRH) est également une propriété technologique liée à la structure chimique des polysaccharides végétaux.

Notre résultat (1,8 g d'huile/g de fleur sèche) était similaire à celles des farines obtenues à partir des fleurs d'*Opuntia stricta* et d'*Opuntia ficus-indica* (1,4 à 1,7 g d'huile/g d'échantillon sec) [135] et des cladodes d'*Opuntia* épineux et sans épines (1,29 à 1,31 g d'huile/g de poids sec) [136]. Ils étaient similaires aux fibres d'autres fruits, légumes et algues ( $\leq 2$  g/g).

Le PRH dépend essentiellement de la composition des fibres, de la densité de charge globale, des propriétés de surface et de la nature hydrophobe des particules de fibres [137]. De plus, le PRH reflète la capacité émulsifiante qui représente une caractéristique hautement souhaitable dans le domaine de la fabrication des produits alimentaires ou cosmétiques.

### III.1.6. Teneur en matière grasse

D'après les résultats présentés dans le tableau III-1, la teneur totale en matière grasse de la fleur sèche d'*Opuntia ficus-barbarica* était d'environ 4% de la matière sèche. Ce résultat était similaire à celui obtenu par Ammar et al. [138] qui ont rapporté une teneur totale en matières grasses de 3,5% de la matière sèche dans la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* tunisienne au stade de post-floraison. Plusieurs facteurs influent sur la teneur de lipides, y compris le stade de développement des fleurs qui est probablement dû à la morphologie et aux changements physiologiques de la fleur et aux différences de facteurs environnementaux, tels que les changements de conditions météorologiques. La valeur obtenue par Ammar et al. [138] pour la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* au stade de post-floraison est représentée par 17 acides gras avec une prédominance des acides polyinsaturés principalement les acides linoléique (C18 : 2) et linoléique (C18 : 3), ce qui confère les multiples propriétés phytothérapeutiques de cette fleur.

### III.1.7. Teneur en sucres totaux

D'après les résultats donnés dans le tableau III-1, on remarque que la teneur en sucres totaux de la fleur sèche d'*Opuntia ficus-barbarica* est de l'ordre de  $6,75 \pm 0,08$  g/100 g. Notre résultat montrent que la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* renferme une teneur en sucres totaux proche de celle trouvée par Chahdoura et al [33] et Ammar et al [135], qui ont trouvé des valeurs de  $6,7 \pm 0,1$  g/100g et  $5,9 \pm 0,5$  g/100g respectivement.

La variabilité de ces résultats est liée à plusieurs facteurs qui influencent sur la composition chimique de la plante, tels que l'âge, le stade de maturation, la localisation géographique, les conditions climatiques et l'état physiologique de la plante lors de l'analyse.

Selon la teneur obtenue dans notre étude, ces fleurs constitueraient une source non négligeable de sucres qui donnent aux fleurs leurs saveurs agréables. Ce qui favorise la valorisation de ces fleurs en plusieurs produits alimentaires ou cosmétiques. Cela justifie leurs utilisations pour nous essayer de développer des méthodes d'extraction innovantes, dont le but est la production des ingrédients actifs et naturels.

### **III.1.8. Teneur en protéines**

La teneur en protéines de la fleur sèche d'*Opuntia ficus-barbarica* était  $4,94 \pm 0,22$  g/100g de la matière sèche. En outre, Ammar et al. [135] ont rapporté que le niveau de protéines dans les fleurs de cactus au stade de post-floraison était d'environ 5,7% de la matière sèche. Cette valeur est en accord avec la valeur obtenue dans notre étude.

Cette teneur en protéines pourrait être attribuée aux étamines qui contiennent du pollen puisque les fleurs d'*Opuntia* ont été ramassées lors de leur fermeture, sachant que le pollen est très important comme source de protéines. Les fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* pourraient être considérées comme une bonne source de protéines car elles fournissent des teneurs similaires à celles d'autres légumes [17].

### **III.1.9. Fibres**

Les fibres alimentaires sont des polymères glucidiques d'origine végétale, constituées de mélanges complexes de glucides dans la paroi cellulaire ou du cytoplasme des cellules végétales [137]. Actuellement, la nécessité d'utiliser des polymères hydrosolubles biodégradables alternatifs pour les produits en aval tels que les détergents et les cosmétiques a pris une importance croissante.

Le dosage des fibres alimentaires effectué sur la poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* est de 16,37 g/100 g de la matière sèche. Ce qui suggère qu'elle constituait de bonnes sources de fibres qui comprennent des polysaccharides et des substances de tissu végétal telles que la lignine et la cellulose [139].

### **III.1.10. Couleur**

La solution liquide des fleurs de cactus a été caractérisée par des valeurs élevées des paramètres L\* et b\* de l'échelle Hunter Lab, qui indiquant une luminosité dans la couleur jaune. Ces paramètres sont importants lorsque la fleur est utilisée comme ingrédient alimentaire. Cette couleur jaune peut être améliorée certains aliments afin de les rendre plus acceptables. Cependant, si la fleur est utilisée dans un liquide, comme les jus, la couleur jaune est cohérente avec la couleur des autres produits végétaux.

### **III.1.11. Teneur en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol**

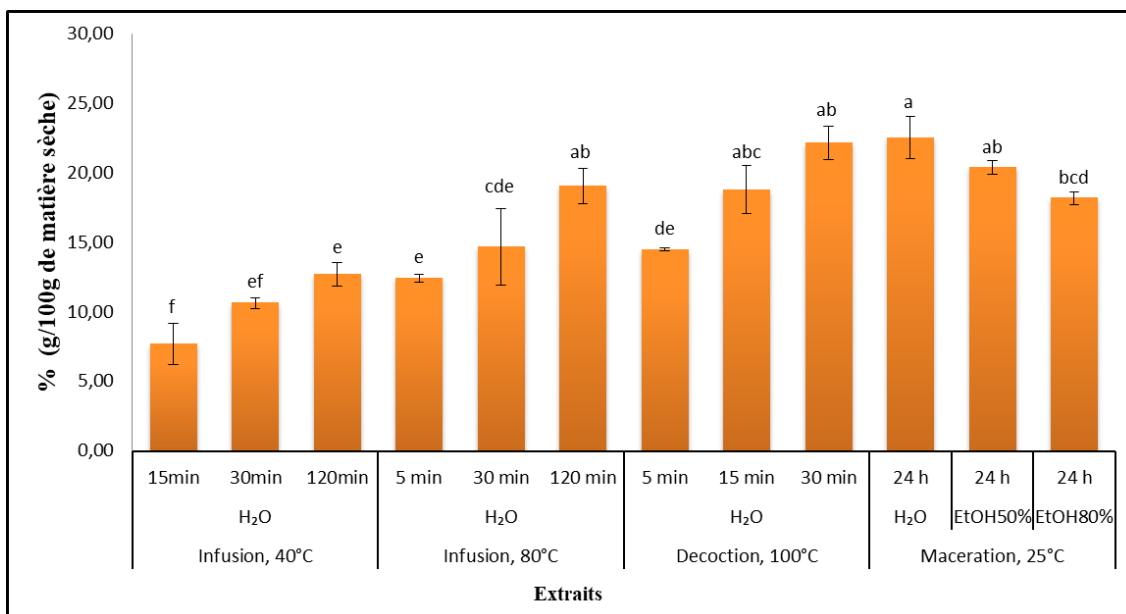
Comme on peut l'observer dans le tableau III-1, les substances extractibles par l'eau montrent une teneur significativement plus élevée (31,64 g/100g) que celles des substances extractibles par l'éthanol (5,33 g/100g) ( $p < 0,05$ ). Les données obtenues montrent que la teneur en substances biologiquement actives dans les extraits de la fleur est très dépendante de la nature du solvant utilisé. La teneur des substances extractibles était liée à la présence de molécules solubles [136]. En effet, l'extrait aqueux avaient une teneur en sucres solubles plus élevée que l'extrait éthanolique ce qui pourrait être responsable de cette différence de valeurs de teneur des substances extractibles entre les deux solvants eau et éthanol. Ainsi, l'extrait aqueux a le plus haut rendement en polysaccharides qui justifie leur viscosité. L'extrait éthanolique est riche en substances biologiquement actives comme les flavonoïdes [140].

## **III.2. Extractions conventionnelles**

### **III.2.1. Rendement des extractions**

Le choix de la méthode d'extraction est un paramètre clé qui affecte de manière significative l'efficacité du processus. De plus, la nature du solvant, la température et le temps d'extraction affectent considérablement l'efficacité de l'extraction.

Dans cette étude, des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* ont été préparés par infusion et décoction à l'eau. Ces extractions ont été effectuées à différentes températures à différents moments d'extraction. La voie de macération a également été réalisée en utilisant différents rapports eau/éthanol. Pour les extraits aqueux, les rendements d'extraction variaient de 7,67% à 22,54% et étaient d'environ 20,36% pour les extraits hydroalcooliques (Figure III-2).



**Figure III-2 : Rendements des différents extraits aqueux et hydroalcoliques de fleurs sèches de figuier de barbarie (*Opuntia ficus-barbarica*). Différentes lettres indiquent des différences statistiques selon le test post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ). Chaque valeur est exprimée en moyenne  $\pm$  écart type ( $n = 6 \times 2$ ).**

Les rendements d'extraction des différentes méthodes ont diminué dans l'ordre suivant : M.H<sub>2</sub>O > D30' > M.EtOH50 > I80°120' > D15' > MEtOH80 > I80°30' > D5' > I40°120' > I80°5' > I40°30' > I40°15'. On peut voir que le rendement en extrait aqueux de macération (M.H<sub>2</sub>O 22,54%) était supérieur à celui de l'extrait hydroalcolique (M.EtOH50 20,36% et M.EtOH80 18,17%). Cela montre que le rendement d'extraction augmente lorsque l'on augmente la polarité du solvant utilisé pour l'extraction des composés phytochimiques. Des résultats similaires ont rapporté que l'extrait méthanolique de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* présente un rendement d'environ 23,64% [27], alors que pour l'extrait aqueux, il était de 29,74% [116]. De plus, les rendements en extraits aqueux obtenus par infusion à 80°C qui ont duré 120 min (19,05%) et décoction pendant 30 min (22,14%) étaient proches de ceux extraits par macération en utilisant de l'eau comme solvant pendant 24h (22,54%). Le rendement de l'infusion à 80°C variait de 12,44% pendant 5 min à 19,05% pendant 120 min et était supérieur par rapport à l'infusion à 40°C qui variait de 7,67% pendant 15 min à 12,69% pendant 120 min. Ces résultats ont montré que l'augmentation du temps et de la température d'extraction améliore le rendement d'extraction. Aussi, l'augmentation de la concentration en eau dans le solvant améliore le rendement d'extraction. Le rendement le plus élevé observé dans le cas des extractions aqueuses peut être dû à la présence de composés autres que les constituants phénoliques. Cela peut être attribuable à la plus grande solubilité des protéines et des glucides dans l'eau.

### III.2.2. Résultats de criblage phytochimique

#### III.2.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

En ce qui concerne une comparaison générale entre toutes les méthodes d'extraction, les principales conclusions sont décrites et présentées par la suite dans le tableau III-2. La teneur totale en phénols (TPC) des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* variait de  $113,94 \pm 12,39$  (M.H<sub>2</sub>O) à  $184,15 \pm 3,06$  mg EAG / g (I40°120 ') pour les extraits aqueux et de  $189,40 \pm 4,23$  (M.EtOH50) à  $226,66 \pm 7,77$  mg EAG / g (M.EtOH80) pour les extraits hydroalcooliques.

Concernant la teneur totale en flavonoïdes (TFC), la quantité la plus élevée était de  $89,65 \pm 1,92$  mg ER/g obtenue dans le cas d'extrait hydroalcoolique utilisant la macération EtOH 80%. Cependant, la TFC pour l'extrait préparé par macération avec de l'eau était d'environ  $33,24 \pm 4,65$  mg d'ER/g. En comparaison, les extraits aqueux obtenus par infusion à 40 °C pendant 15 min, 30 min et 120 min, l'infusion à 80 °C pendant 5 min et 30 min et la décoction pendant 5 min ont montré une TFC plus élevée qui variait entre  $56,57 \pm 2,26$  mg ER/g et  $58,27 \pm 0,38$  mg d'ER/g.

**Tableau III-2 : Polyphénols totaux et flavonoïdes d'extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*.**

Méthode, T (°C), Solvent	Temps d'extraction	Polyphénols totaux (mg EAG / g d'extrait)	Flavonoïdes (mg ER / g d'extrait)
Infusion, 40 °C, H <sub>2</sub> O	15 min	$169,74 \pm 4,74$ <sup>c d</sup>	$54,99 \pm 1,71$ <sup>c</sup>
	30 min	$176,69 \pm 3,68$ <sup>b c</sup>	$56,57 \pm 2,26$ <sup>c</sup>
	120 min	$184,15 \pm 3,06$ <sup>b</sup>	$58,56 \pm 2,59$ <sup>c</sup>
Infusion, 80 °C, H <sub>2</sub> O	5 min	$158,96 \pm 8,07$ <sup>c</sup>	$54,85 \pm 1,27$ <sup>c</sup>
	30 min	$177,92 \pm 5,74$ <sup>b c</sup>	$54,27 \pm 1,51$ <sup>c</sup>
	120 min	$169,59 \pm 8,26$ <sup>c d</sup>	$49,02 \pm 1,87$ <sup>d</sup>
Décoction, 100 °C, H <sub>2</sub> O	5 min	$165,65 \pm 7,04$ <sup>c d</sup>	$58,27 \pm 0,38$ <sup>c</sup>
	15 min	$138,16 \pm 1,18$ <sup>e</sup>	$47,68 \pm 1,33$ <sup>d</sup>
	30 min	$129,81 \pm 6,09$ <sup>e</sup>	$47,19 \pm 1,30$ <sup>d</sup>
Macération, 25 °C, H <sub>2</sub> O	24 h	$113,94 \pm 12,39$ <sup>f</sup>	$33,24 \pm 4,65$ <sup>e</sup>
Macération, 25 °C, EtOH50%	24 h	$189,40 \pm 4,23$ <sup>b</sup>	$69,71 \pm 3,73$ <sup>b</sup>
Macération, 25 °C, EtOH80%	24 h	$226,66 \pm 7,77$ <sup>a</sup>	$89,65 \pm 1,92$ <sup>a</sup>

Chaque valeur est exprimée en moyenne  $\pm$  écart type (n = 6  $\times$  2).

Dans chaque colonne, des lettres différentes signifient des différences significatives avec un p < 0,05. Ils se réfèrent au test post-hoc de Tukey ; par conséquent, des valeurs différentes significatives ont été classées en utilisant des lettres dans l'ordre alphabétique.

Des résultats similaires ont été rapportés par Alimi et al. [27] où le contenu phytochimique des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* extraites à l'aide d'une solution de méthanol à 50% était de  $159,76 \pm 0,32$  mg EAG/g de contenu phénolique total et de  $79,51 \pm 0,57$  mg ER/g de flavonoïdes. De plus, Ammar et al. [29] ont rapporté que l'extrait méthanolique (100% de méthanol) préparé par la méthode soxhlet présentait une plus grande teneur en phénols totaux que les extraits aqueux et hydroalcooliques ( $270,9 \pm 7,2$  mg EAG/g d'extrait). Alors que les flavonoïdes étaient proches de l'extrait aqueux mais inférieurs par rapport à l'extrait hydroalcoolique M.EtOH80 ( $60,81 \pm 1,3$  mg ER / g d'extrait).

Les moyennes des teneurs totales en polyphénols et en flavonoïdes pour les extraits hydroalcooliques se sont avérées comparables à celles des extraits aqueux ( $P < 0,05$ ). Pour une extraction assistée par infusion à 40 °C qui a duré 15 minutes et 30 minutes, les teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes étaient approximativement équivalentes aux teneurs phytochimiques obtenues en cas d'infusion à 80 °C pendant 5 minutes et de décoction à 100 °C pendant 5 minutes. Pour l'extraction assistée par décoction à 100 °C, la TFC a diminué en augmentant le temps de l'extraction de 5 min à 30 min. L'accélération des processus d'auto-oxydation résultant de la température peut traduire cela [141]. Les TFC étaient plus faibles dans les extraits obtenus à des températures élevées (80 °C et 100 °C).

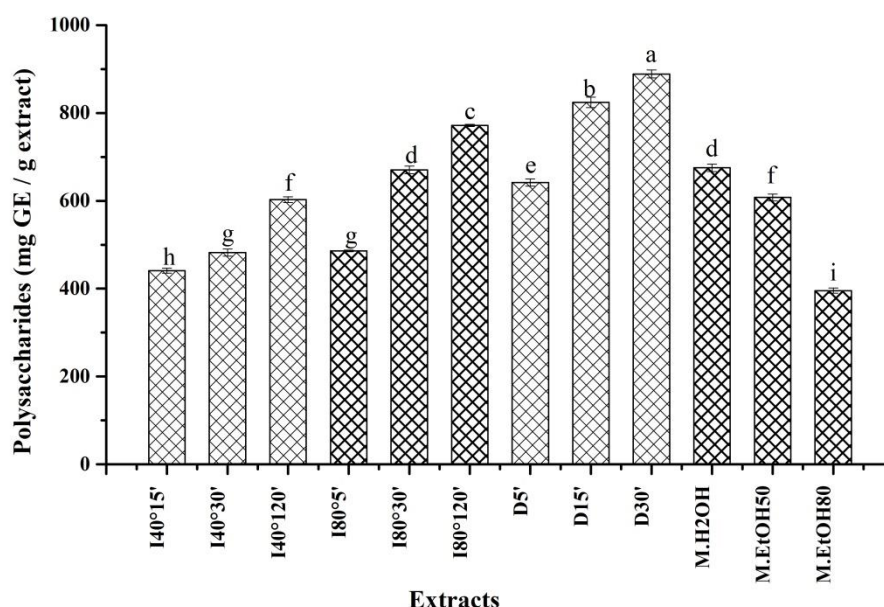
On peut conclure que les fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* renferme une quantité importante en polyphénols et flavonoïdes et les meilleures conditions pour extraire ces substances bioactives est opter pour une macération à température ambiante dans un solvant polaire éthanol/eau (80/20) pour une durée de 24 heures.

Les flavonoïdes sont responsables de diverses activités pharmacologiques [142], telles que l'activité antioxydante, la capacité de piégeage des radicaux libres, la prévention des maladies coronariennes, les activités hépatoprotectrices, anti-inflammatoires et anticancéreuses [41]. Donc, il serait avantageux de consommer des préparations de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* en raison de leur richesse en composés flavonoïdes bénéfiques pour la santé humaine.

#### **III.2.4. Estimation de la teneur en polysaccharides**

Nous avons également déterminé la teneur en polysaccharides des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* (Figure III-3). Les résultats des extraits aqueux ont montré une teneur plus élevée en polysaccharides par rapport aux extraits hydroalcooliques. La teneur totale en polysaccharides variait de  $395,5 \pm 5,9$  mg / g à  $888,9 \pm 9,1$  mg / g. Les meilleurs

résultats ont été marqués dans les extraits aqueux préparés aux températures les plus élevées. Les polysaccharides sont généralement présents dans les plantes et sont bien connus pour leurs bienfaits thérapeutiques [143]. Ces dernières années, les polysaccharides ont reçu une attention considérable en raison de ses remarquables activités pharmacologiques, notamment Anti-cancer du côlon [144], anti-tumeur [145], immunorégulation [146], activité hypoglycémique [147], effet antibactérien [148] et l'activité antioxydante [87]. Cela suggère que les propriétés thérapeutiques des extraits ne dépendent pas seulement de leur teneur phénolique totale, mais également de la présence de polysaccharides. De plus, les extraits bruts contiennent d'autres composants qui peuvent avoir des effets positifs ou négatifs en raison de leur interaction avec des composés phénoliques qui influencent les activités biologiques [149].



**Figure III-3 : Teneur en polysaccharides des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*. Différentes lettres indiquent des différences statistiques selon le test post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ). Chaque valeur est exprimée en moyenne  $\pm$  écart type ( $n = 6 \times 2$ ).**

### III.2.5. Résultat de l'activité antioxydantes

De nombreuses enquêtes ont rapporté les puissantes propriétés antioxydantes des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* en raison de leur riche teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes qui sont bien connus pour leurs activités antioxydantes. Dans la présente étude, nous avons évalué l'activité antioxydante de différents extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*, obtenus via différentes préparations traditionnelles. Ici, la plupart des extraits ont montré une activité antioxydante élevée, y compris une activité d'élimination des radicaux

libres, une inhibition du blanchiment par le  $\beta$ -carotène et un pouvoir réducteur. L'extrait hydroalcoolique préparé en utilisant la macération EtOH 80% a présenté l'activité la plus importante. Les résultats des valeurs  $CE_{50}$  des activités antioxydantes sont présentés dans le tableau III-3. La séquence des capacités d'élimination des radicaux DPPH<sup>\*</sup> des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* a été classée comme suit : extraits hydroalcooliques à 25 °C > extraits d'eau chaude > extrait d'eau à 25 °C.

**Tableau III-3 : Valeurs  $EC_{50}$  des activités antioxydantes des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*.**

Méthode, T(°C), Solvant	Temps d'extraction	$EC_{50}^a$ of DPPH radical-scavenging activity ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$EC_{50}^b$ of $\beta$ -carotene bleaching inhibition ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$EC_{50}^c$ of reducing power ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Infusion, 40 °C, H <sub>2</sub> O	15 min	277,0 $\pm$ 1,9 <sup>f</sup>	325,3 $\pm$ 3,2 <sup>d</sup>	475,7 $\pm$ 18,1 <sup>c</sup>
	30 min	254,5 $\pm$ 3,0 <sup>e</sup>	284,9 $\pm$ 13,5 <sup>c</sup>	468,4 $\pm$ 15,3 <sup>c</sup>
	120 min	215,7 $\pm$ 1,2 <sup>c</sup>	264,8 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>	466,1 $\pm$ 20,7 <sup>c</sup>
Infusion, 80 °C, H <sub>2</sub> O	5 min	272,6 $\pm$ 2,3 <sup>f</sup>	327,6 $\pm$ 14,9 <sup>d</sup>	457,7 $\pm$ 5,4 <sup>c</sup>
	30 min	240,8 $\pm$ 4,1 <sup>d</sup>	274,1 $\pm$ 3,5 <sup>c</sup>	458,7 $\pm$ 27,2 <sup>c</sup>
	120 min	317,1 $\pm$ 7,8 <sup>h</sup>	384,4 $\pm$ 8,6 <sup>e</sup>	468,7 $\pm$ 17,0 <sup>c</sup>
Décoctions, 100 °C, H <sub>2</sub> O	5 min	294,1 $\pm$ 1,8 <sup>g</sup>	345,7 $\pm$ 1,1 <sup>d</sup>	464,1 $\pm$ 13,3 <sup>c</sup>
	15 min	337,5 $\pm$ 6,1 <sup>i</sup>	484,6 $\pm$ 7,7 <sup>f</sup>	490,6 $\pm$ 8,7 <sup>c</sup>
	30 min	380,0 $\pm$ 3,2 <sup>j</sup>	487,7 $\pm$ 4,3 <sup>f</sup>	503,4 $\pm$ 5,3 <sup>c</sup>
Macération, 25 °C, H <sub>2</sub> O	24 h	403,9 $\pm$ 9,9 <sup>k</sup>	511,5 $\pm$ 16,1 <sup>g</sup>	567,6 $\pm$ 41,8 <sup>d</sup>
Macération, 25 °C, EtOH50%	24 h	124,1 $\pm$ 4,8 <sup>b</sup>	209,5 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	355,5 $\pm$ 29,9 <sup>b</sup>
Macération, 25 °C, EtOH80%	24 h	76,8 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	165,2 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	321,6 $\pm$ 18,6 <sup>a</sup>
Trolox		3,2 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,3	34,6 $\pm$ 0,9

<sup>a</sup>  $EC_{50}$  signifie la concentration efficace d'échantillon qui peut diminuer la concentration de DPPH de 50%

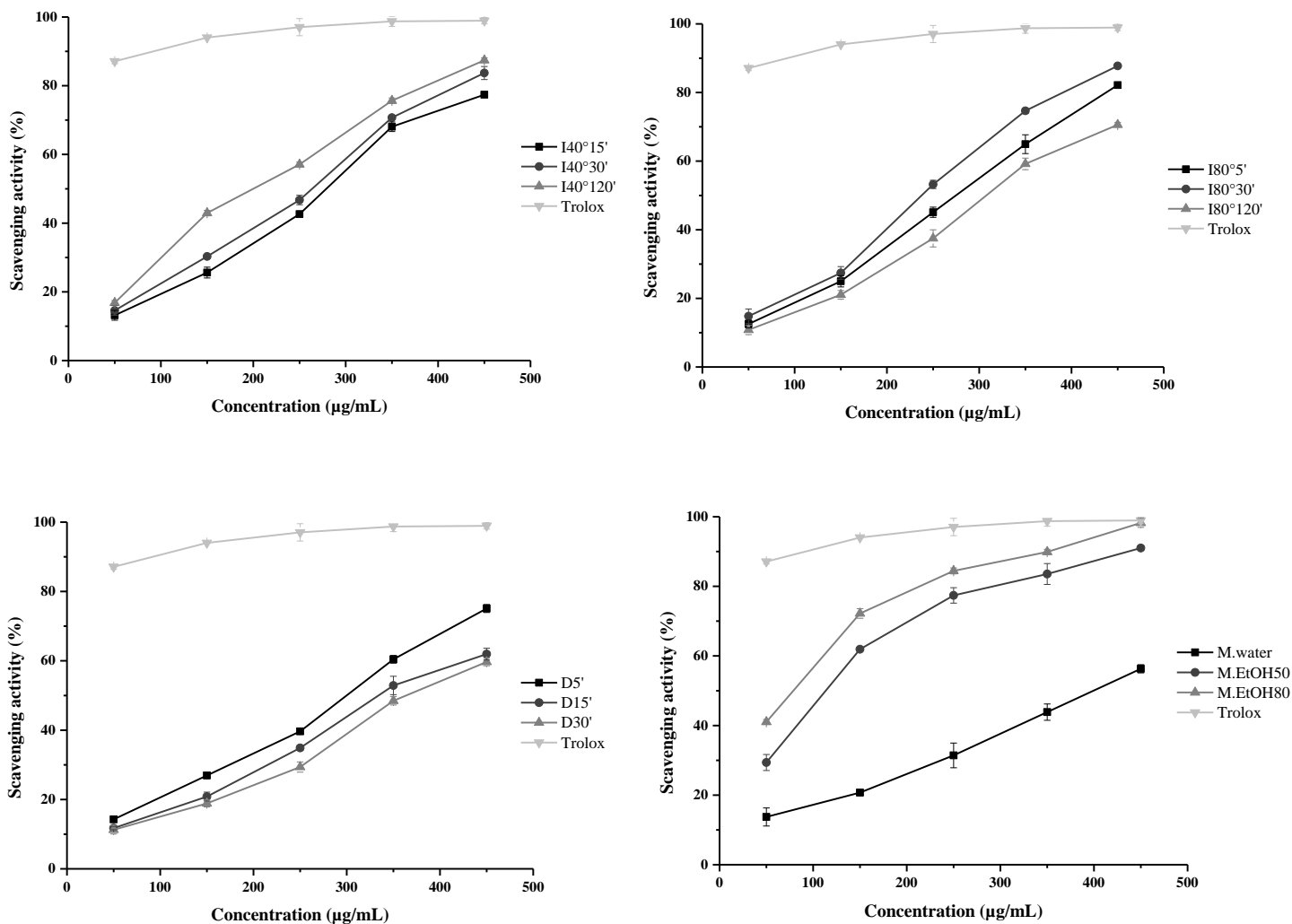
<sup>b</sup>  $EC_{50}$  signifie la concentration efficace d'échantillon qui peut inhiber la peroxydation de l'acide  $\beta$ -carotène linoléique de 50%

<sup>c</sup>  $EC_{50}$  est la concentration pour laquelle l'absorbance à 700 nm est de 0,5.

Dans chaque colonne, des lettres différentes signifient des différences significatives avec un  $p < 0,05$ . Ils se réfèrent au test post-hoc de Tukey, par conséquent, des valeurs différentes significatives ont été classées en utilisant des lettres dans l'ordre alphabétique.

À 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , les capacités de piégeage des radicaux DPPH<sup>\*</sup> étaient de 89,9%, 83,5%, 75,6%, 74,6%, 60,4%, 43,9% pour M.EtOH80, M.EtOH50, I40°120', I80°30', D5', M.H<sub>2</sub>O, respectivement (Figure III-4). Les résultats présentés dans le tableau III-3 montrent que les valeurs de  $CE_{50}$  pour les extraits aqueux variaient de 215,7 à 403,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et ses valeurs pour les extraits hydroalcooliques étaient de 76,8 et 124,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour M.EtOH80 et M.EtOH50, respectivement.



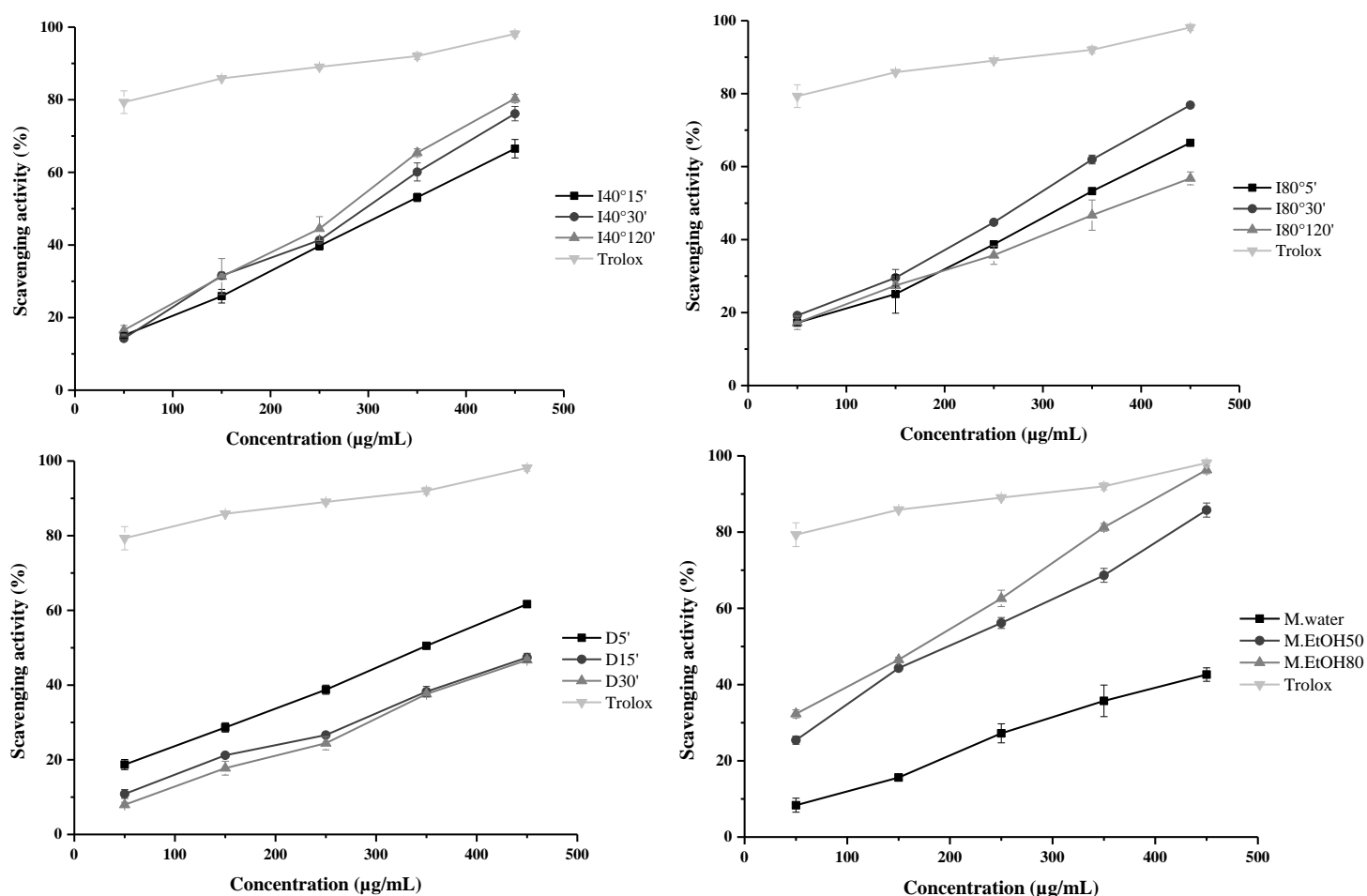


**Figure III-4 : Activité de piégeage des radicaux DPPH d'extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparés par diverses méthodes à différentes concentrations. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  écart type (n = 3).**

Pour le test de blanchiment au  $\beta$ -carotène, la figure III-5 montre que l'activité antioxydante des échantillons peut être classée comme suit : M.EtOH80 > M.EtOH50 > I40°120' > I80°30' > I40°30' > I40°15' > I80°5' > D5' > I80°120' > D15' > D30' > M.H<sub>2</sub>O.

À 350  $\mu\text{g/mL}$ , les inhibitions du blanchiment par le  $\beta$ -carotène étaient de 35,7%, 68,7% et 81,3% pour M.H<sub>2</sub>O, M.EtOH50 et M.EtOH80 respectivement, de 53,1%, 60,1% et 65,4% pour I40°15', I40°30' et I40°120', respectivement, de 53,3%, 61,9% et 46,7% pour I80°5', I80°30' et I80°120', respectivement, et de 50,5%, 38,32% et 37,6% pour D5', D15' et D30', respectivement. Pour les extractions aqueuses, les meilleures activités ont été obtenues pour des échantillons préparés par infusion à 40°C pendant 120 min (I40°120'), infusion à 80°C pendant 30 min (I80°30') et décoction à 100 °C pendant 5 min (D5').

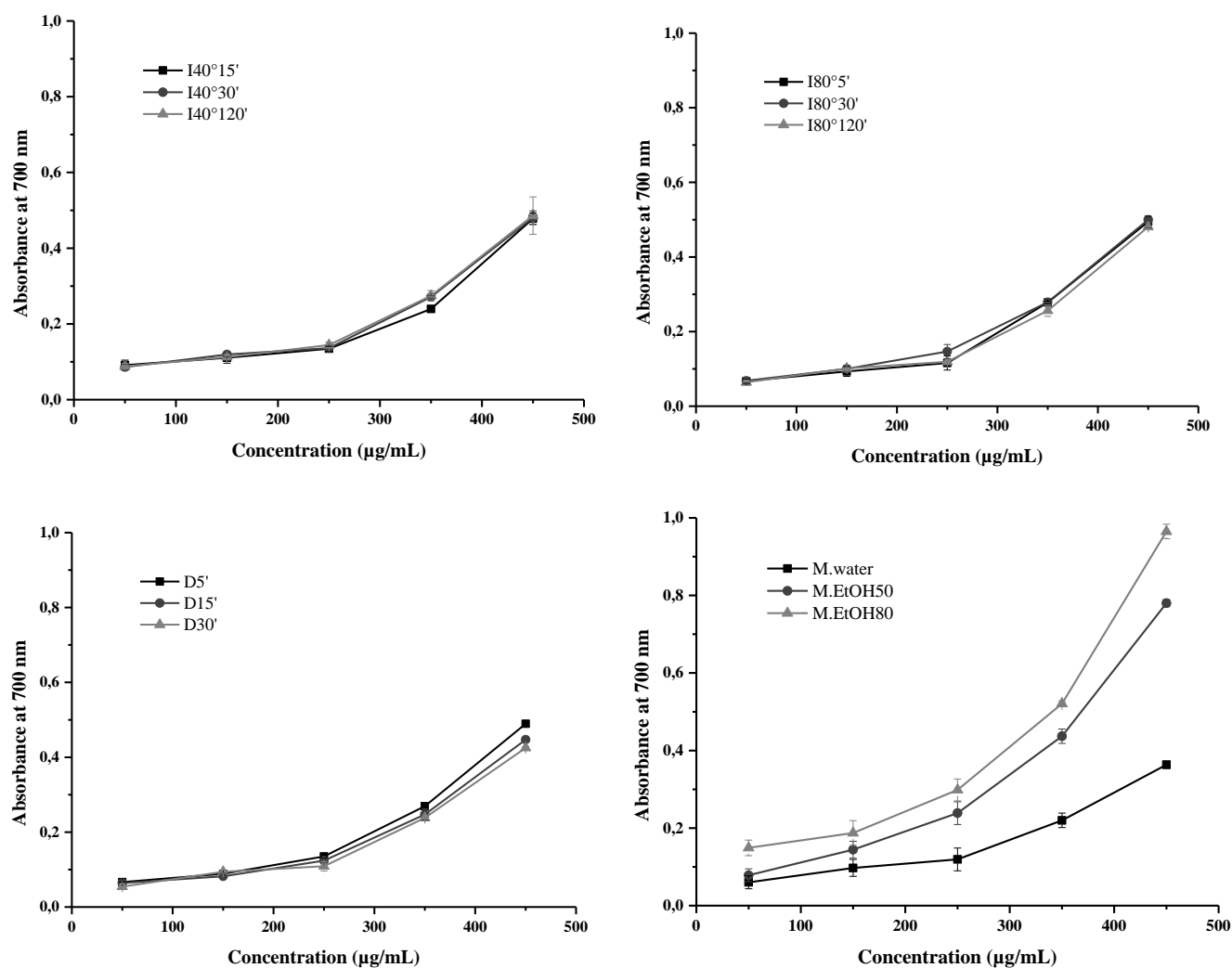
À 450  $\mu\text{g/mL}$ , l'inhibition est passée à 85,8% et 96,4% pour les extraits hydroalcooliques M.EtOH50 et M.EtOH80, respectivement. Pour les extraits aqueux, il était de 80,3%, 76,9% et 61,7% pour I40°120', I80°30' et D5', respectivement. Les résultats du test de blanchiment au  $\beta$ -carotène ont montré que les extraits hydroalcooliques ont l'activité la plus élevée avec des valeurs de  $\text{CE}_{50}$  de 165,2 et 209,5  $\mu\text{g/mL}$  pour M.EtOH80 et M.EtOH50.



**Figure III-5 : Activité d'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparés par diverses méthodes à différentes concentrations. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  écart type (n = 3).**

La figure III-5 illustre que l'absorbance augmente lorsque la concentration d'extrait augmente. En fait, des valeurs d'absorbance plus élevées indiquent une capacité de réduction plus forte. L'extrait de M.EtOH80 présentait le pouvoir réducteur le plus élevé tandis que l'extrait de M.H<sub>2</sub>O présentait celui le plus faible. La séquence de réduction de la puissance était la suivante : M.EtOH80 > M.EtOH50 > I80°5' > I80°30' > D5' > I40°120' > I40°30' > I40°15' > I80°120' > D15' > D30' > M.H<sub>2</sub>O.

Pour M.EtOH80 et M.EtOH50, les valeurs de CE<sub>50</sub> du pouvoir réducteur étaient respectivement de 321,6 et 355,5 µg/mL, et celles pour I80°5', I80°30', D5', I40°120', I40°30', I40°15', I80°120', D15', D30' et M.H<sub>2</sub>O EC<sub>50</sub> étaient respectivement de 457,7 ; 458,5 ; 464,1 ; 466,1 ; 468,4 ; 468,7 ; 475,7 ; 490,6 ; 503,4 et 567,6 µg/mL.



**Figure III-6 : Pouvoir réducteur d'extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparés par diverses méthodes à différentes concentrations. Les valeurs sont la moyenne ± écart type (n = 3)**

Les résultats des dosages antioxydants des différents extraits ont été comparés et corrélés à leur teneur en composés phytochimiques. L'analyse a montré une forte corrélation entre le contenu phénolique total et les valeurs de CE<sub>50</sub> de l'inhibition des β-carotènes ( $r^2 = 0,910$ ), les valeurs de CE<sub>50</sub> de l'activité anti-radicalaire DPPH ( $r^2 = 0,885$ ) et les valeurs de CE<sub>50</sub> du pouvoir réducteur ( $r^2 = 0,794$ ). De même, les teneurs totales en flavonoïdes ont montré une bonne corrélation avec les valeurs de CE<sub>50</sub> du pouvoir réducteur ( $r^2 = 0,922$ ) et les valeurs de CE<sub>50</sub> de l'activité anti-radicalaire DPPH ( $r^2 = 0,884$ ). Cependant, la teneur totale en flavonoïdes était faiblement corrélée aux valeurs CE<sub>50</sub> de l'inhibition des β-carotènes de blanchissement ( $r^2 = 0,753$ ). De plus, il y avait une étroite corrélation entre les teneurs totales en phénoliques et en flavonoïdes totaux ( $r^2 = 0,850$ ). Ammar et al. [29] n'ont trouvé aucune corrélation directe entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*, ce qui a été attribué à la présence de nombreux autres composants qui contribuent également à l'activité antioxydante. Les différents extraits obtenus en utilisant différents solvants organiques et méthodes contiennent des composés mineurs qui pourraient avoir un impact majeur sur l'activité antioxydante [29]. Dans notre cas, les polysaccharides et les extraits phénoliques ont été extraits séparément. Ainsi, nos résultats ont montré que les composants phénoliques jouent un rôle important dans la capacité antioxydante des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*.

### III.2.6. Comparaison entre les méthodes d'extraction conventionnelles

Tous ces résultats indiquent que les extraits naturels de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* contiennent une grande variété de composés chimiques auxquels des capacités antioxydantes pourraient être attribuées.

De nombreuses recherches ont mis en évidence les puissantes propriétés thérapeutiques des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*. C'est l'une des sources les plus potentielles de molécules bioactives naturelles. Les principaux objectifs de cette étude étaient de comparer l'efficacité d'extraction phytochimique des différentes procédures d'extraction utilisées pour consommer cette fleur et d'évaluer ses valeurs nutritionnelles.

Dans ce travail, des extraits préparés par infusion, décoction et macération de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* ont été analysés en fonction de leur teneur en composés phytochimiques et de leurs activités antioxydantes. Parmi tous les échantillons d'extrait, l'extrait hydroalcoolique préparé par macération EtOH80% a montré la teneur la plus élevée en composés phénoliques et les activités antioxydantes les plus fortes. Pour les extraits

aqueux, l'extraction par infusion à 40 °C pendant 120 min, l'infusion à 80 °C pendant 30 min et la décoction pendant 5 min étaient les meilleures techniques d'extraction naturelles. Considérant que, l'extraction de macération utilisant H<sub>2</sub>O à 25 °C qui a duré 24 heures produit la plus faible teneur en composés phénoliques et une faible activité antioxydante. L'extraction aqueuse préparée par décoctions fournit la plus forte teneur en polysaccharides, ce qui justifie leur aspect visqueuse.

Le choix de la méthode d'extraction dépend des types de métabolites qui devraient être extraits des matières végétales. Des teneurs élevées en composés phénoliques et flavonoïdes ont été obtenues pour les extractions hydroalcooliques à température ambiante et également pour les extractions aqueuses effectuées à des températures élevées dans de courtes durées. Alors que les techniques aqueuses, menées à des températures élevées et de longue durée, étaient caractérisées par une teneur élevée en polysaccharides.

### III.3. Extraction hydro-éthanolique assistée par ultrasons (UAHE)

#### III.3.1. Effet des conditions d'extraction sur la teneur totale en phénols

Le contenu phénolique total (TPC) d'extrait de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparé dans différentes conditions des UAHE est indiqué dans le tableau III-3. Le TPC le plus élevé (242,72 mg EAG/g d'extrait) a été obtenu dans la condition numéro 16 avec un rapport liquide/solide de 60 mL/g, concentration d'éthanol de 50% (v/v) et un temps d'extraction de 30 min. En revanche, la teneur en polyphénols totaux la plus faible (97,22 mg EAG/g d'extrait) a été observée dans l'essai expérimental numéro 6 avec un rapport liquide/solide de 60 mL/g en utilisant de l'eau pure pendant 45 min.

**Tableau III-4 : Les données d'expérience pour TPC, TFC, DPPH et FRAP d'extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparés par l'UAHE en utilisant Box Behnken Design.**

Run	Conditions de l'extraction						Réponses			
	Variables codées			Variables réelles			TPC (mg EAG/g extrait)	TFC (mg ER/g extrait)	DPPH ( $\mu$ mol ET/g extrait)	FRAP ( $\mu$ mol ET/g extrait)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Rapport liquide/solide (mL/g)	Concentration d'éthanol (%)	Temps (min)				
1	-1	-1	0	20	0	30	149,68	36,61	122,55	251,59
2	-1	1	0	20	100	30	187,49	68,75	188,48	376,26
3	1	-1	0	100	0	30	125,46	26,56	115,04	249,03
4	1	1	0	100	100	30	226,97	84,97	213,22	406,31
5	0	-1	-1	60	0	15	134,45	30,1	109,26	244,77
6	0	-1	1	60	0	45	106,81	19,69	89,64	228,19
7	0	1	-1	60	100	15	191,33	56,47	164,97	359,57
8	0	1	1	60	100	45	178,7	77,03	199,41	383,45
9	-1	0	-1	20	50	15	213,35	48,14	176,13	342,57
10	1	0	-1	100	50	15	196,38	79,25	156,49	346,89
11	-1	0	1	20	50	45	185,53	59,03	174,22	344,4
12	1	0	1	100	50	45	196,24	60,42	164,51	370,13
13	0	0	0	60	50	30	237,06	79,23	213,34	377,84
14	0	0	0	60	50	30	241,14	79,89	215,17	363,9
15	0	0	0	60	50	30	238,44	81,73	225,98	360,12
16	0	0	0	60	50	30	242,72	81,73	216,94	368,29
17	0	0	0	60	50	30	239,62	74,35	226,82	370,25

En comparaison, le TPC des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* de la présente étude était plus élevé que les travaux précédents [23,29]. Dans une étude, l'approche de macération à l'hexane pendant une semaine a montré un TPC de  $49,00 \pm 0,80$  mg EAG/g d'extrait [23]. De plus, l'extraction à l'aide d'un extracteur Soxhlet pendant 6 h a atteint un TPC de  $270,9 \pm 7,2$

mg EAG/g d'extrait pour le méthanol et  $58,7 \pm 1,6$  mg EAG/g d'extrait pour l'eau, tandis que la macération pendant 24 h à température ambiante a abouti à un TPC de  $227,8 \pm 7,2$  mg EAG/g d'extrait pour le méthanol et de  $44,2 \pm 1,6$  mg EAG/g d'extrait pour l'eau [29].

Les données expérimentales ont été affichées à l'aide d'un modèle polynomial de second ordre donné par l'équation suivante :

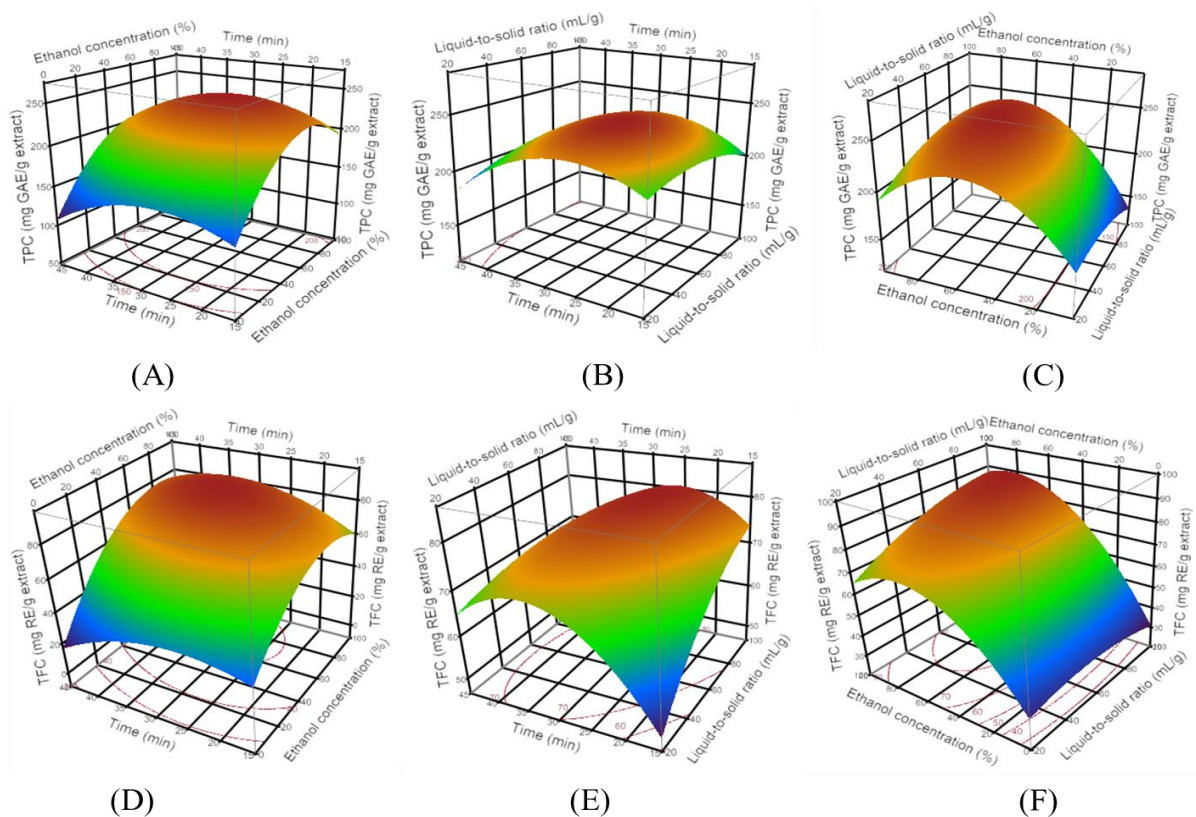
$$Y_{\text{TPC}} = 239.80 + 1 X_1 + 33.39 X_2 - 8.53 X_3 + 15.68 X_1 X_2 + 6.92 X_1 X_3 + 3.75 X_2 X_3 - 11.30 X_1^2 - 56.35 X_2^2 - 30.62 X_3^2 \quad (3)$$

L'ANOVA de TPC analysée par la BBD et les coefficients de régression estimés sont représentés dans le tableau III-5. Un modèle de régression quadratique significatif a été obtenu ( $p < 0,001$ ), alors qu'aucun manque d'ajustement significatif n'a été détecté ( $p > 0,05$ ). En conséquence, le modèle choisi était en bon accord avec TPC. Le coefficient de régression ( $R^2 = 0,997$ ) indique un bon ajustement entre les résultats expérimentaux et théoriques du TPC. La concentration d'éthanol ( $X_2$ ) et le temps d'extraction, en tant que variables individuelles, affectent le TPC ( $p < 0,05$ ). Tous les termes quadratiques et tous les coefficients d'interaction ont également une influence très significative ( $p < 0,05$ ).

**Tableau III-5 : Estimation des coefficients de régression pour le modèle polynomial quadratique et l'analyse de la variance pour TPC, TFC, DPPH et FRAP de l'extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparés par l'UAHE.**

Paramètres	Coefficients estimés				Prob (P) > F			
	TPC	TFC	DPPH	FRAP	TPC	TFC	DPPH	FRAP
Intercepter	239,796	79,386	219,65	368,08				
X <sub>1</sub> (Rapport liquide/solide)	1,0	4,8338	0,235	7,1925	0,4842	0,0275	0,9468	0,0102
X <sub>2</sub> (Concentration d'éthanol)	33,38625	21,783	42,9488	69,0013	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
X <sub>3</sub> (Temps)	-8,52875	0,2763	2,61625	4,04625	0,0004	0,8785	0,4666	0,0909
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	15,675	6,5675	11,5625	8,1525	<,0001	0,0322	0,0471	0,0268
X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>	6,92	-7,43	2,4825	5,3525	0,0086	0,0195	0,6214	0,1095
X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>	3,7525	7,7425	13,515	10,115	0,0909	0,0163	0,0261	0,0105
X <sub>1</sub> * X <sub>1</sub>	-11,29675	-4,638	-14,655	-0,14	0,0005	0,0948	0,0167	0,9621
X <sub>2</sub> * X <sub>2</sub>	-56,34925	-20,526	-41,673	-47,143	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
X <sub>3</sub> * X <sub>3</sub>	-30,62425	-13,038	-37,158	-16,943	<,0001	0,001	<,0001	0,0006
Model					<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Défaut d'ajustement (Lack of fit)					0,0645	0,0805	0,1032	0,7446
R <sup>2</sup>					0,9966	0,9776	0,9799	0,9953

Les valeurs de surface tridimensionnelles tracées représentent l'effet des variables indépendantes sur TPC (Figure III-7). Comme le montre la figure III-7 A, le TPC augmente lorsque la concentration d'éthanol et le temps d'extraction augmentent (effet synergique). Le TPC augmente également avec l'amélioration du rapport liquide/solide et du temps d'extraction. Cependant, lorsque le temps d'extraction dépasse 39 min, TPC commence à diminuer lentement comme cela est montré sur la figure 1B. La figure III-7 C montre que le TPC augmente lorsque le rapport liquide/solide et la concentration d'éthanol augmentent. Cela indique que certains composés phénoliques se dissolvent facilement à l'aide de solvants organiques faiblement polaires comme l'éthanol mélangé à différents niveaux d'eau [82, 83]. La présente étude confirme l'efficacité et les avantages considérables de la technologie des ultrasons. Cette technique améliore l'extraction de certains composants et réduit considérablement le temps d'extraction. De plus, il se caractérise par une reproductibilité élevée et un faible coût de mise en œuvre. L'irradiation ultrasonique crée des bulles de cavitation qui s'effondrent qui perturbent la paroi cellulaire et libèrent les composés dans le solvant [42, 84].



**Figure III-7 : Surfaces de réponse de variables indépendantes sur la teneur totale en phénols (A-C) et la teneur totale en flavonoïdes (D-F) des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparés par UAHE en utilisant un rapport constant de solvant sur solide ( $X_1$ ) à 60 mL/g A et D) ; en utilisant une concentration constante d'éthanol ( $X_2$ ) à 50% (B et E) ; et en utilisant un temps constant ( $X_3$ ) pendant 30 min (C et F).**



### III.3.2. Effet des conditions d'extraction sur la teneur totale en flavonoïdes

Les données expérimentales moyennes de TFC d'extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparés dans diverses conditions des UAHE sont résumées dans le tableau III-3. Le TFC le plus élevé a été observé dans les essais expérimentaux numéro 4 (84,97 mg ER/g d'extrait) avec un rapport liquide-solide de 100 mL/g, 100% de concentration d'éthanol et un temps d'extraction de 30 min. La teneur la plus faible a été détectée dans l'essai numéro 6 (19,69 mg ER/g d'extrait) avec un rapport liquide-solide de 60 mL/g, de l'eau pure et un temps d'extraction de 45 min. Le TFC, obtenu dans cette expérience, était plus élevé que celui précédemment rapporté. Le TFC était de 27,47 mg ER/g d'extrait pour une étude qui utilisait la voie de macération avec du méthanol pendant 24 h et était d'environ 60,81 mg ER/g d'extrait pour l'extracteur Soxhlet pendant 6 h [26]. Notre résultat de 84,97 mg RE/g d'extrait est nettement plus élevé. Ces résultats confirment que la teneur des composés polyphénoliques dans les extraits UAHE est plus élevée.

Les données expérimentales ont été ajustées à l'aide de l'équation de régression du second ordre :

$$Y_{\text{TFC}} = 79.39 + 4.83 X_1 + 21.78X_2 + 0.28 X_3 + 6.57 X_1X_2 - 7.43 X_1X_3 + 7.74 X_2X_3 - 4.64 X_1^2 - 20.53 X_2^2 - 13.04X_3^2 \quad (4)$$

Le tableau III-5 résume les coefficients de régression estimés pour le modèle choisi et l'analyse de variance (ANOVA) du TFC. La valeur  $R^2$  de 0,978, confirme que le modèle statistique BBD proposé décrit très bien la variation des propriétés étudiées en fonction des facteurs expérimentaux et confirme également la forte corrélation entre les valeurs expérimentales et prédites. De plus, les p-values obtenues ( $p > 0,05$  pour défaut d'ajustement et  $p < 0,001$  pour le modèle) confirment la fiabilité du modèle statistique établi. Le rapport solide-liquide ( $X_1$ ) et la concentration d'éthanol ( $X_2$ ) semblent être les variables indépendantes individuelles qui influencent le TFC ( $p < 0,05$ ). De plus, tous les coefficients d'interaction et deux termes quadratiques ( $X_2 * X_2$  et  $X_3 * X_3$ ) affectent également positivement le TFC ( $p < 0,05$ ). L'interaction des trois variables indépendantes ; Le rapport liquide/solide, la concentration d'éthanol et le temps d'extraction ont été utilisés pour tracer les courbes de réponse de surface du TFC en utilisant l'équation tridimensionnelle (4) comme le montre la figure III-7. Augmenter la concentration d'éthanol de 0 à 100% et le temps d'extraction de 15 à 45 min améliore le TFC (figure III-7 D). Le rapport liquide-solide et l'interaction du temps

d'extraction résultent principalement en une amélioration du TFC. Cependant, à près de 20 mL/g et 40 min, une petite diminution du TFC a été observée (figure III-7 E) (effet antagoniste). Le TFC augmente avec l'augmentation du rapport liquide/solide et de la concentration d'éthanol (figure III-7 F). En outre, le TFC obtenu en utilisant une concentration d'éthanol élevée pendant un temps d'extraction court était supérieur aux extraits préparés en utilisant une faible concentration en éthanol et une durée plus élevée. Le temps d'extraction est un facteur important pour l'élaboration des procédés industriels. Réduire le temps d'extraction, tout en conservant une plus grande quantité de composés phénoliques sera économique pour une bonne efficacité d'extraction industrielle [77,152,153].

### III.3.3. Effet des conditions d'extraction sur la capacité antioxydante

La capacité antioxydante des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* utilisant les UAHE a été mise en œuvre pour évaluer la fiabilité des modèles mathématiques RSM afin de prédire les variances optimales et d'identifier les forces des corrélations entre les différents paramètres expérimentaux. Les analyses de variance pour les valeurs expérimentales du BBD sont présentées dans le tableau III-4.

L'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de deux méthodologies in vitro : DPPH et FRAP. Les valeurs de DPPH des 17 extractions étaient entre la moyenne de 89,46 à 226,82  $\mu\text{mol ET / g}$  d'extrait. Les conditions de l'essai numéro 17 : 50 mL/g, concentration d'éthanol à 50% et 30 min de temps d'extraction, ont présenté la valeur DPPH la plus élevée. La valeur FRAP la plus élevée (406,31  $\mu\text{mol ET/g}$  d'extrait) a été obtenue dans l'essai expérimental numéro 4 avec 100 mL/g, une concentration d'éthanol dans l'eau à 100% et 30 min de temps d'extraction. Alors que la valeur la plus basse (228,19  $\mu\text{mol ET/g}$  d'extrait) a été obtenue dans l'essai expérimental numéro 6 avec 60 mL/g, de l'eau pure et 45 min de temps d'extraction.

Toutes les données expérimentales utilisant les UAHE ont été effectuées par plusieurs régressions pour s'adapter aux équations polynomiales du second ordre pour DPPH et FRAP comme suit :

$$Y_{DPPH} = 219.65 + 0.24 X_1 + 42.95 X_2 + 2.62 X_3 + 11.56 X_1X_2 + 2.48 X_1X_3 + 13.52 X_2X_3 - 14.66 X_1^2 - 41.67 X_2^2 - 37.16 X_3^2 \quad (5)$$

$$Y_{FRAP} = 368.08 + 7.19 X_1 + 69.00 X_2 + 4.05 X_3 + 8.15 X_1X_2 + 5.35 X_1X_3 + 10.12 X_2X_3 - 0.14 X_1^2 - 41.14 X_2^2 - 16.94 X_3^2 \quad (6)$$

Les coefficients de régression estimés du modèle de régression multiple, la probabilité (valeurs p) du modèle, le manque d'ajustement et le  $R^2$  de toutes les réponses BBD analysées sont présentés dans le tableau III-5.

L'analyse de la variance de DPPH et FRAP a montré la signification et l'ajustement correct des modèles prédits, dans lesquels les valeurs p étaient de 0,0001 ( $p < 0,05$ ) pour les deux méthodes d'évaluation des antioxydants. Pour le défaut d'ajustement, les valeurs p étaient de 0,103 et 0,745 ( $p > 0,05$ ) pour DPPH et FRAP, respectivement. Les valeurs  $R^2$  de 0,980 et 0,995 correspondant respectivement à DPPH et FRAP indiquent des corrélations élevées entre les résultats d'activité antioxydante réelle et prévue.

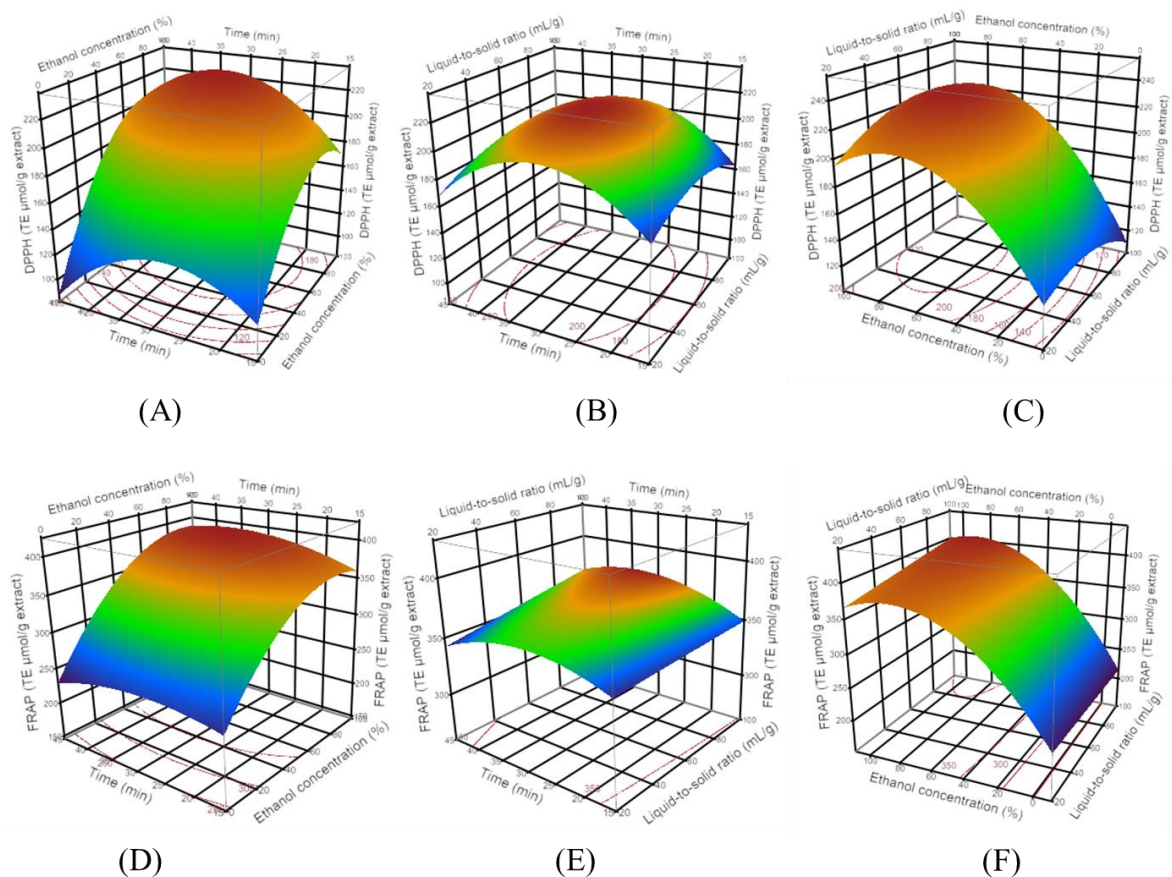
### **III.3.3.1. DPPH**

L'interaction entre les variables a été tracée à l'aide de la courbe de surface de réponse tridimensionnelle employant l'équation 5, comme le montre la figure III-8. Test de balayage DPPH basé sur l'interaction entre les variables indépendantes a soutenu le rôle efficace de la concentration d'éthanol dans l'eau et également le temps de l'extraction (Figure III-8 A). Les valeurs de DPPH les plus élevées de la capacité de piégeage des radicaux libres ont été obtenues à une concentration d'éthanol plus élevée et dans des durées d'extraction courtes. Le dosage de piégeage DPPH plus élevé, obtenu à une concentration plus élevée d'éthanol dans l'eau, indique que l'éthanol est un solvant efficace en peu de temps. La valeur de DPPH diminue lorsque le temps d'extraction augmente et que la concentration d'éthanol diminue. Cela indique que certains composés phénoliques sont dégradés à un temps d'extraction plus élevé et à une concentration d'éthanol dans l'eau plus faible au cours du processus UAHE. Selon des études, la dégradation des acides phénoliques se produit à un temps de sonication très long [80,154]. Globalement, l'absorption du solvant est plus élevée au début de l'extraction ce qui explique la quantité importante de substances antioxydantes pendant la première partie de l'extraction [77]. Dans le cas de 50% de concentration d'éthanol, la valeur de DPPH a augmenté lorsque le rapport liquide/solide augmente de 20 à 85 mL/g et le temps d'extraction augmente de 20 à 40 min. Cependant, au-dessus de 38 min, DPPH diminue considérablement pour tous les rapports liquide/solide (Figure III-8 B). Ceci démontre que les composés antioxydants sont dégradés par l'interaction du temps d'extraction et du rapport liquide sur solide. Comme illustré sur la figure III-8 C, la valeur de DPPH augmente lors de l'augmentation du rapport liquide/solide et de la concentration d'éthanol.

### III.3.3.2. FRAP

Les diagrammes de surface tridimensionnels de FRAP avec l'interaction entre les variables sont illustrés sur la figure III-8. La valeur FRAP augmente lors de l'augmentation de la concentration d'éthanol à près de 44% et le temps d'extraction à 21 min (figure III-8 D). La valeur FRAP commence à augmenter lorsque le rapport liquide-solide et le temps d'extraction augmentent (figure III-8 E). En outre, l'augmentation du rapport liquide-solide et de la concentration d'éthanol améliore encore la valeur FRAP (figure III-8 F).

Dans la présente étude, la DPPH était fortement corrélée au TPC et au TFC plutôt qu'au FRAP. Cela indique que la composition de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*, y compris les polyphénols, peut être responsable de l'activité antioxydante de l'extrait. L'extraction par ultrason à longue durée (45 min) et l'utilisation de concentration plus élevée (80%) d'éthanol dans l'eau, augmente considérablement l'activité antioxydante sans dégrader les composés phénoliques par rapport aux extractions utilisant de l'eau pure. Par conséquent, l'extraction d'antioxydants naturels, y compris les substances phénoliques et flavonoïdes, à l'aide de solvants organiques faiblement polaires, tels que l'éthanol, mélangés à un niveau d'eau adéquat, peut être efficace pour atteindre le meilleur rendement d'extraction. Comme on peut l'observer, la teneur en antioxydants naturels augmente considérablement lorsque la concentration en éthanol augmente jusqu'à 80%. La polarité du solvant éthanol est relativement inférieure à celle de l'eau, ce qui entraîne un constant diélectrique réduit [2,96,155].



**Figure III-8 : Surfaces de réponse de variables indépendantes sur l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH (A-C) et le pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP (D-F) de l'extrait de fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* par UAHE en utilisant un rapport constant de solvant sur solide ( $X_1$ ) à 60 mL/g (A et D) ; en utilisant une concentration constante d'éthanol ( $X_2$ ) à 50% (B et E) ; et en utilisant un temps constant ( $X_3$ ) à 30 min (C et F).**

### III.3.4. Vérification des conditions optimales prédictives

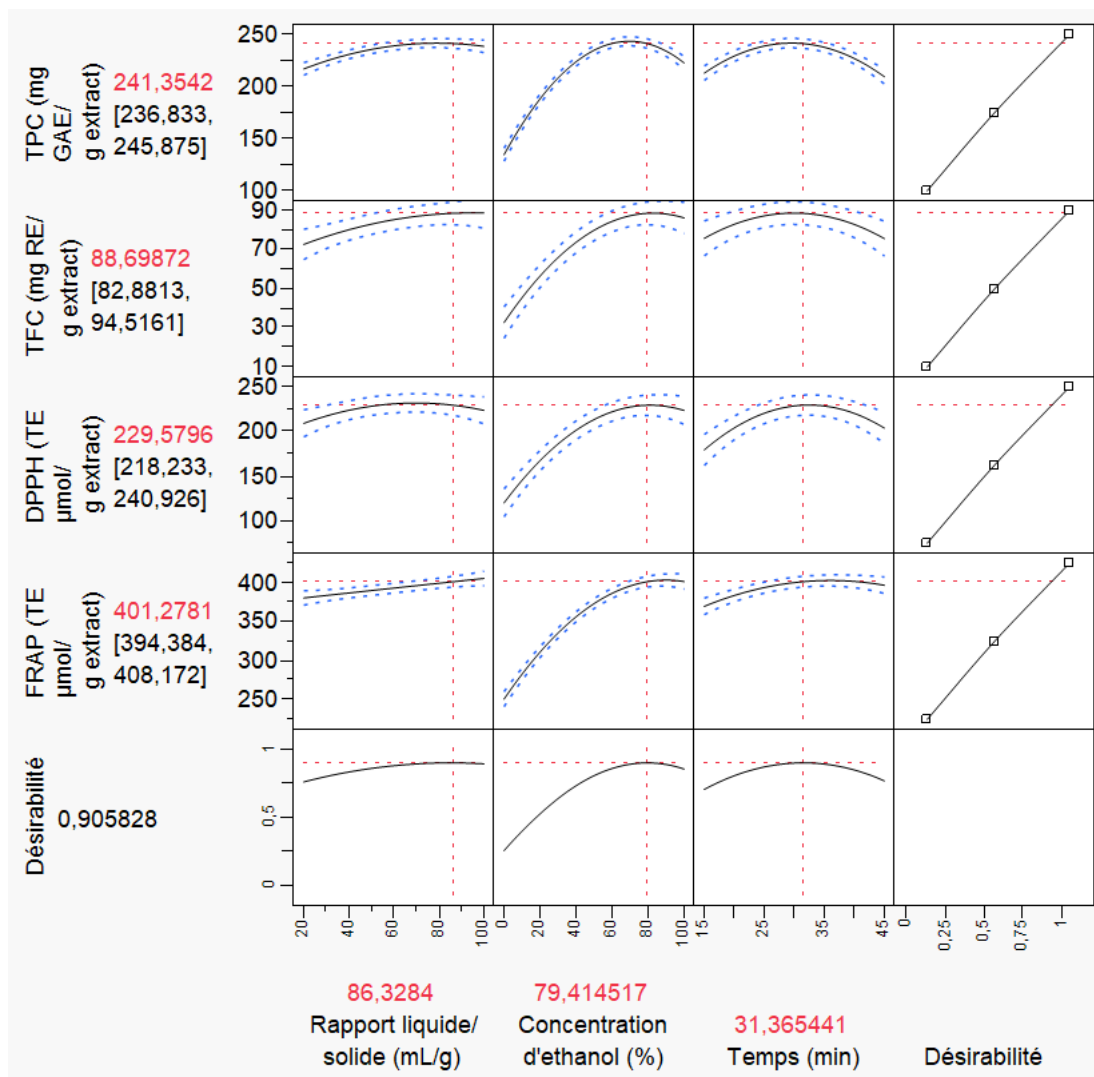
Les niveaux estimés des conditions d'extraction optimales, pour une réponse plus élevée de TPC, TFC, DPPH et FRAP d'extrait de fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* obtenu par UAHE, sont présentés dans le tableau III-6. Les conditions prédites de UAHE étaient de 70 mL/g, 65% d'éthanol dans l'eau durant 29 min, qui fournissent le maximum de TPC (245,70 mg GAE/g d'extrait), tandis que les conditions 95 mL/g, 85% d'éthanol dans l'eau durant 29 min fournissent le maximum de TFC (89,27 mg RE/g d'extrait). Le DPPH maximum (230,15 μmol ET/g d'extrait) a été atteint dans les conditions prévues de 70 mL/g, 80% d'éthanol dans l'eau durant 32 min, et le FRAP maximum (411,19 μmol ET/g d'extrait) a été atteint à 100mL/g, 90% d'éthanol dans l'eau durant 38 min. Les conditions optimales de UAHE qui fournissaient les variables dépendantes maximales (TPC, TFC, DPPH et FRAP) étaient de 85

mL/g, 80% d'éthanol dans l'eau pendant 32 min où le TPC était de 240,83 mg GAE/g d'extrait, le TFC était de 88,55 mg RE/g d'extrait, DPPH était de 230,15  $\mu$ mol ET/g d'extrait et FRAP était de 401,50  $\mu$ mol ET/g d'extrait (Figure III-9). Ces résultats ont été vérifiés avec les données expérimentales. Le TPC obtenu était de  $244,91 \pm 9,31$  mg GAE / g d'extrait, le TFC était de  $92,51 \pm 3,85$  mg RE/g d'extrait, le DPPH était de  $224,71 \pm 7,78$   $\mu$ mol ET/g d'extrait et le FRAP était de  $426,79 \pm 6,65$   $\mu$ mol ET/g d'extrait. Le coefficient de variation entre toutes les valeurs prévues et expérimentales n'était pas significatif. Par conséquent, on peut conclure que le modèle algorithmique RSM était raisonnable et a aidé avec succès à obtenir les conditions optimales UAHE pour les fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*. Cela indique que l'utilisation UAHE pour l'extraction d'antioxydants naturels de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* a considérablement réduit le temps d'extraction. Les conditions optimales obtenues dans cette étude pourraient être utiles pour améliorer le nouveau procédé UAHE utilisé dans l'industrie verte.

**Tableau III-6 : Données expérimentales de validation des valeurs prédites dans des conditions d'extraction optimales UAHE.**

Variable dépendante	Valeur prédite	Valeur expérimentale	% Différence (CV)
TPC (mg EAG/g extrait)	241,35	$244,91 \pm 9,31$	1,04
TFC (mg ER/g extrait)	88,70	$91,68 \pm 0,94$	2,34
DPPH ( $\mu$ mol ET/g extrait)	229,58	$224,71 \pm 7,78$	1,52
FRAP ( $\mu$ mol ET/g extrait)	401,28	$426,79 \pm 6,65$	4,36

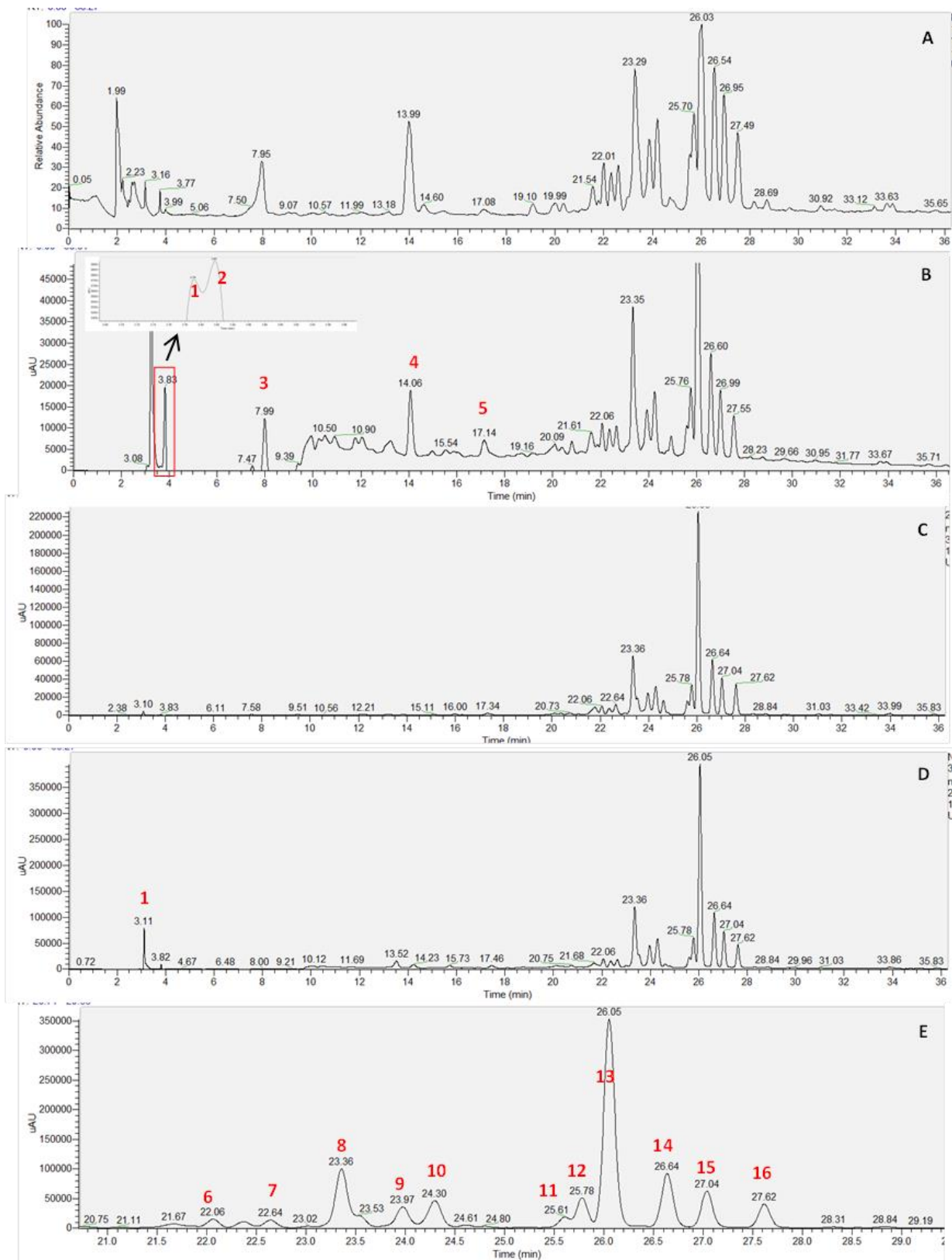
Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'écart type (n = 3), CV = Coefficient de variation



**Figure III-9 : Diagramme 2D des effets des paramètres d'extraction UAHE sur TPC, TFC, DPPH et FRAP.**

### III.3.5. Identification des molécules active de l'extrait optimisé UAHE par LC-DAD-ESI-MS

L'extrait le plus riche (85 mL/g, 80% EtOH, durant 32 min) caractérisé par les polyphénols les plus antioxydants a été identifié en effectuant une analyse LC-DAD-MS. L'identification de chaque composé individuel a été effectuée en comparant son temps de rétention, l'ordre d'éluion, le spectre UV-Visible (UV  $\lambda_{\max}$  à 250–280, 320–360 nm) et les données spectrométriques ESI-MS (fragments MS et MS/MS) avec des standards authentiques et les données de la littérature. Comme le montre le tableau III-7 et figure III-10, 16 composés polyphénols antioxydants ont été identifiés dans l'extrait UAHE, dont cinq dérivés de l'acide hydroxycinnamique et onze flavonols glycosidiques.



**Figure III-10 : Chromatogrammes de l'extrait UAHE obtenus par HPLC-DAD/ EIS-MS, (A) : MS en mode ion négatif, (B) : UV à 280 nm, (C) : UV à 320nm, (D) : UV à 260 nm et (E) : UV à 370 nm. Les composés sont indiqués dans le tableau III-7.**



Le chromatogramme HPLC-UV, acquis à 280-320 nm, a présenté 5 pics (composé 1-5) avec un spectre UV typique d'acides hydroxycinnamiques a été observé.

Le premier composé a été identifié comme étant l'acide di-caféoylquinique, attribué en fonction de leurs ions pseudo-moléculaires  $[MH]^-$  à m/z de 515 et des ions fragments m/z à 335, 173 et 191 [156].

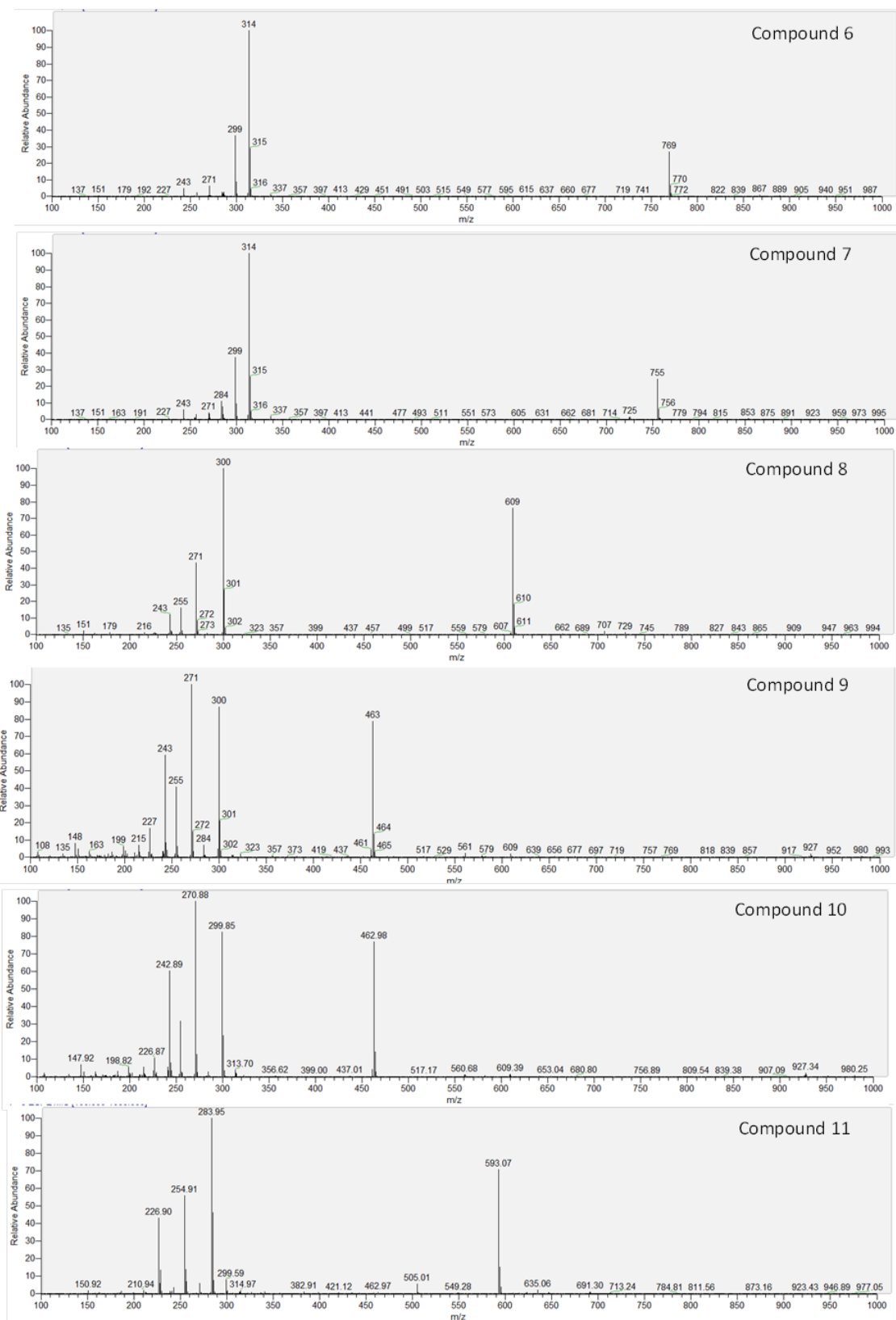
Le composé 2 a été attribué à l'acide quinique, qui est caractérisé par l'ion  $[M-H]^-$  à m/z de 191 et un ion fragment à m/z 173 ([acide quinique-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>).

Le composé 3, avec des ions pseudo-moléculaires  $[MH]^-$  à m/z 355, a libéré des ions de fragment MS/MS caractéristiques à m/z de 193 qui correspondent à ([acide ferrique-H]<sup>-</sup>) et m/z de 315 indiquant une fraction glucarique, a été attribuée au feruloyl-D-glucose.

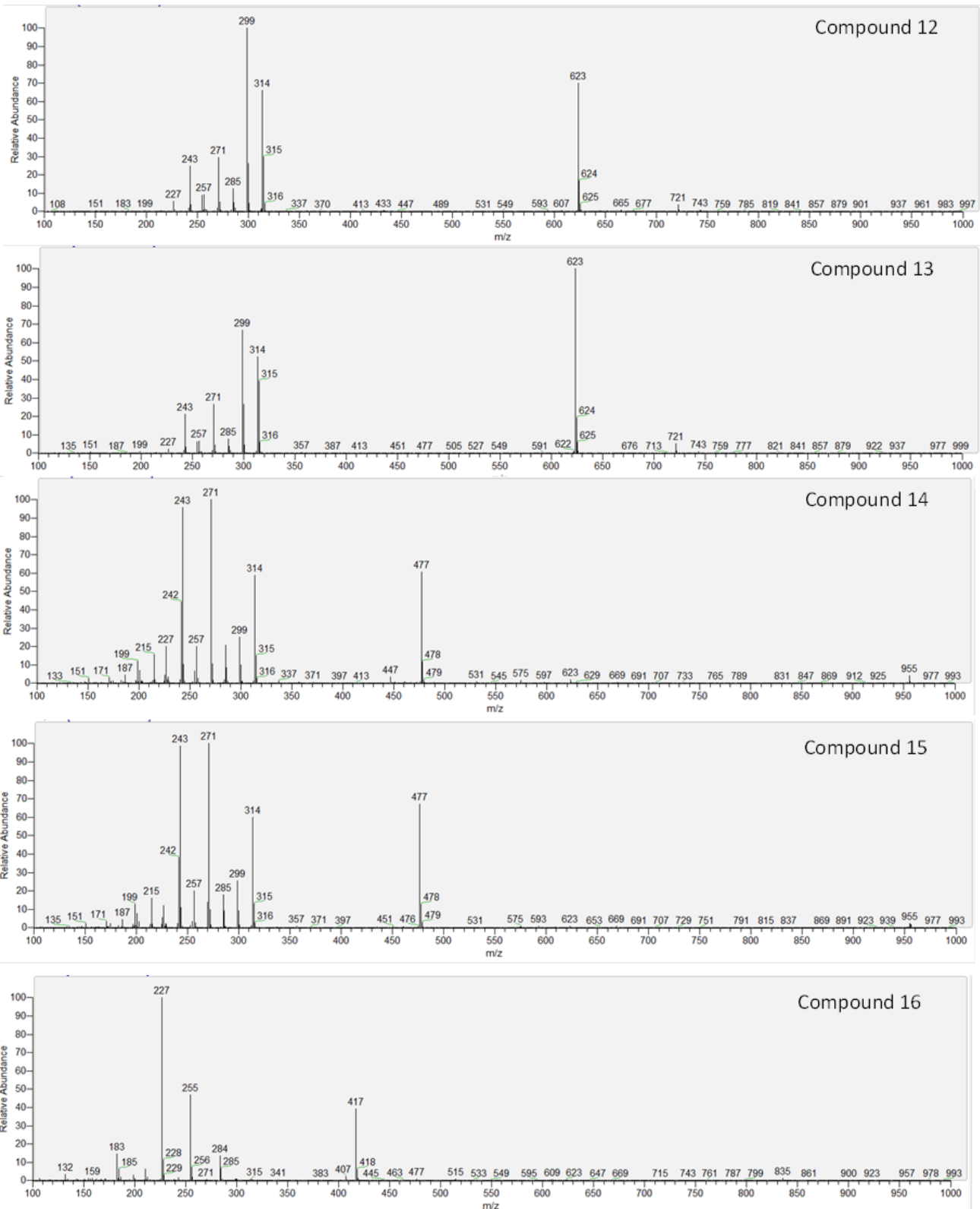
Le composé 4 a été identifié comme un des dérivés d'acide caféique qui ont été attribués en fonction de leurs spectres UV caractéristiques montrant une longueur d'onde maximale à environ 277 nm et aux ions à m/z de 179 ([acide caféique-H]<sup>-</sup>), 161 ([acide caféique-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>) et 135 ([acide caféique-CO<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>) observés dans les spectres MS/MS.

Un raisonnement similaire peut être appliqué pour attribuer le composé 5 comme dérivé d'acide ferrique. Les spectres MS/MS des ions précurseurs présentaient un fragment de diagnostic commun m/z 193 ([acide ferrique-H]<sup>-</sup>), 175 ([acide ferrique-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>) et 149 ([acide ferrique-CO<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>).

Le chromatogramme HPLC-UV enregistré à 250-360nm présente 11 pics majeurs (composés 6-16) qui ont été détectés. Les spectres UV-Vis de ces composés présentent de forts pics d'absorption de 255 à 265 nm et 350 à 365 nm, caractéristiques des composés de flavonol [40]. Le chromatogramme de masse a montré la présence des molécules déprotonées  $[M-H]^-$  à m/z de 769, 755, 609, 463, 463 593, 623, 623, 477, 477, 417 pour les pics de 6 à 16, respectivement. Les spectres de masse sont rapportés sur la Figure III-11(les composés marqués de 6 à 11) et sur la Figure III-12 (les composés marqués de 12 à 16).



**Figure III-11 : Spectres d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion  $[M-H]^-$  des composés 6-11.**



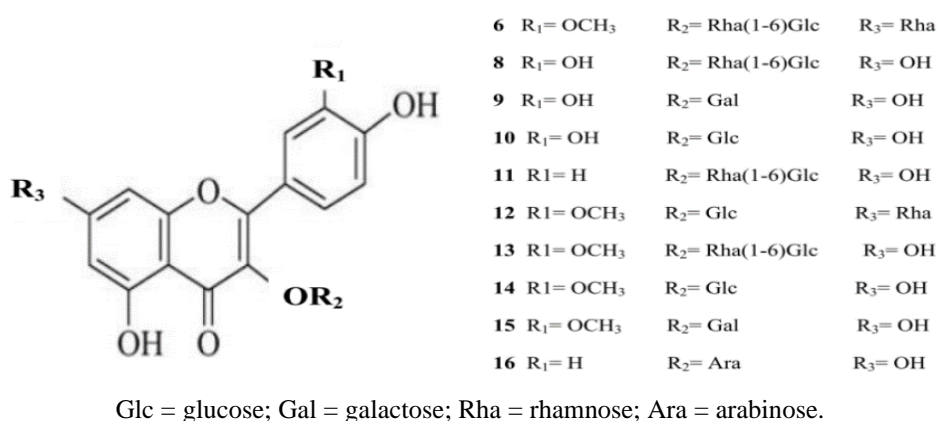
**Figure III-12 : Spectres d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion  $[M-H]^-$  des composés 12-16.**

Les spectres MS/MS de tous les ions de fragments confirment la présence de trois squelettes d'aglycone différents, le kaempférol (m/z de 285) pour les composés 11 et 16, la quercétine (m/z de 301) pour les composés de 8 à 10 et l'isorhamnetine (m/z de 315) pour les composés de 6, 7, et de 12 à 15. En effet, en fonction du temps de rétention, de la masse et des caractéristiques UV-Vis et en les comparant avec les standards et les données bibliographiques, les composés 8, 14 et 16 ont été identifiés positivement comme quercétine-3-O-rutinoside, kaempférol-3-O-rutinoside et isorhamnetin-3-O-rutinoside, respectivement.

Selon UV-Vis et spectres de masse et comme précédemment rapporté par De Leo et al., [28]; Yeddes et al., [22]; Benayad et al., [21]; Chahdoura et al., [33] et Imene Ammar et al., [26], composés 6, 14 et 15 ([MH]<sup>-</sup> à m/z 769, 477 et 477 respectivement) avec un ion fragment MS/MS à m/z 315, ont été identifiés comme isorhamnetin-rutinoside-rhamnoside, isorhamnetin-3-O-glucoside et isorhamnetin-3-O-galactoside, respectivement.

De même, les composés 9 et 10 ([M-H]<sup>-</sup> à m/z 463) avec un ion fragment MS<sup>2</sup> à m/z 301 ont été identifiés comme la quercétine-3-O-galactoside et la quercétine-3-O-glucoside, respectivement. Le composé 16 ([M-H]<sup>-</sup> à m/z 417) avec un ion fragment MS<sup>2</sup> à m/z 285 a été distingué comme kaempférol-3-O-arabinoside. Le composé 12, avec un ion pseudo-moléculaire [M-H]<sup>-</sup> à m/z 623, libérant des fragments à m/z 593 et 315, pourrait être attribué à l'isorhamnetine-glucoside-rhamnoside (Figure III-12).

La structure chimique des flavonoïdes glycosides identifiés de la fleur marocaine d'*Opuntia ficus-barbarica* est représentée sur la figure III-13. Le composé 7 a montré un ion pseudo-moléculaire [MH]<sup>-</sup> à m/z 755, avec un ion produit MS<sup>2</sup> à m/z 315 indiquant un groupement isorhamnetine, qui a permis leur identification en tant que dérivés d'isorhamnetine.



**Figure III-13 : Structures chimiques des glycosides de flavonol identifiés dans l'extrait UAHE des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*.**

L'extrait obtenu par UAHE a été caractérisé par la présence de 14,32 mg et 175,55 mg/g d'extrait d'acides phénoliques totaux et de flavonoïdes, respectivement. L'acide dicaféoylquinique présente le pourcentage le plus élevé (4,37%) d'acides phénoliques identifiés (Tableau III-7). Les flavonoïdes, les principaux composés phénoliques, étaient caractérisés par 36,19% d'isorhamnetin-3-O-rutinoside en tant que composant majeur, suivis par la quercétine-3-O-rutinoside (13,62%), l'isorhamnetin-3-O-glucoside (11,46%), isorhamnetin-3-O-Galactoside (7,32%), quercétine-3-O-glucoside (6,18%), isorhamnetin-glucoside-rhamnoside (5,19%), kaempférol-3-O-arabinoside (4,75%), quercétine-3-O-galactoside (4,05%), dérivés d'isorhamnetine (1,44%), isorhamnetine-rutinoside-rhamnoside (1,30%) et kaempférol-3-O-rutinoside (0,96%).

L'excellente activité antioxydante de l'extrait d'*Opuntia ficus-barbarica* peut être liée à l'effet synergique des composés polyphénoliques et autres présents dans l'extrait de fleur, qui agit comme piègeurs de radicaux libres. Nos résultats sont en accord avec les rapports précédents sur les fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*, dont le principal constituant était l'isorhamnetine 3-O-rutinoside [21,22,26,33]. Sur la base de la littérature, plusieurs propriétés pharmacologiques ont été démontrées par des composés phytochimiques extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*, comme antioxydant [29], anti-inflammatoire [26], anti-ulcérogène [27], ayant des effets antibactériens et cicatrisants [24]. Par conséquent, les antioxydants naturels de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* de l'extrait optimisé sont fortement recommandés à des fins pharmacologiques et nutraceutiques.

**Tableau III-7 : Caractéristiques LC-ESI-MS des composés phénoliques identifiés dans l'extrait optimisé de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*.**

Numéro de pic	Rt (min)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Molecular ion [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS/MS fragments (m/z)	Identification	Quantification (mg/g extract)
<b>Acides phénoliques</b>						<b>14,32 ± 2,71</b>
1	3,79	287	8,31 ± 1,57	335, 191, 173 179, 161	Acide di-caffeoylquinic	8,31 ± 1,57
2	3,82	338	0,87 ± 0,16	173	Acide quinique	0,87 ± 0,16
3	7,99	275	1,46 ± 0,28	315, 193	1-Feruloyl-D-glucose	1,46 ± 0,28
4	14,06	275	2,80 ± 0,53	179	Dérivé d'acide caféique	2,80 ± 0,53
5	17,19	275	0,89 ± 0,17	193, 149	Dérivé d'acide férulique	0,89 ± 0,17
<b>Flavonoïdes</b>						<b>175,55 ± 5,69</b>
6	22,06	254, 354	2,46 ± 0,25	623, 315	Isorhamnetin-rutinoside-rhamnoside	2,46 ± 0,25
7	22,64	255, 351	2,74 ± 0,25	315	Dérivés de l'isorhamnetine	2,74 ± 0,25
8	23,36	256, 354	25,87 ± 0,23	301	Quercetin-3-O- rutinoside	25,87 ± 0,23
9	23,97	256, 354	7,68 ± 0,50	301	Quercetin-3-O-galactoside	7,68 ± 0,50
10	24,29	256, 354	11,74 ± 0,86	301	Quercetin-3-O-glucoside	11,74 ± 0,86
11	25,61	266, 349	1,82 ± 0,14	447, 429, 285	Kaempferol-3-O-rutinoside	1,82 ± 0,14
12	25,78	255, 354	9,86 ± 0,09	593, 315	Isorhamnetin-glucoside-rhamnoside	9,86 ± 0,09
13	26,05	255, 355	68,72 ± 1,16	477, 315	Isorhamnetin-3-O-rutinoside	68,72 ± 1,16
14	26,64	255, 354	21,76 ± 1,64	315	Isorhamnetin-3-O-glucoside	21,76 ± 1,64
15	27,04	255, 354	13,89 ± 0,85	315	Isorhamnetin-3-O-galactoside	13,89 ± 0,85
16	27,62	266, 348	9,02 ± 0,99	285	Kaempferol-3-O-arabinoside	9,02 ± 0,99

### III.4. Extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE, Microwave-assisted aqueous extraction)

#### III.4.1. Effet des conditions d'extraction sur le rendement de l'extrait MAAE d'*Opuntia ficus-barbarica*

Les valeurs moyennes de rendement de chacun des 17 traitements dans les diverses conditions expérimentales de MAAE sont présentées dans le tableau III-8. Le rendement le plus élevé de 22,58% a été obtenu dans le cycle expérimental numéro 12 avec un rapport liquide/solide de 50 mL/g, une puissance à 450 W et 5 cycles d'extraction tandis que le rendement le plus bas de 14,75% a été observé dans le cycle expérimental numéro 1 avec un rapport liquide / solide de 20 mL/g, une puissance à 200 W et 3 cycles d'extraction.

**Tableau III-8 : Les données d'expérience pour le rendement, la teneur totale en phénoliques et en flavonoïdes de l'extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparés par MAAE en utilisant Box Behnken Design.**

Ordre	Conditions d'extractions						Réponse variables		
	Code de variables			Variables décodées			R (%)	TPC (mg EAG/g extrait)	Flavonoïdes (mg/g extrait)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Rapport liquide/solide (mL/g)	Puissance (W)	Nombre de cycles			
1	-1	-1	0	20	200	3	14,75	165,13	68,60
2	-1	1	0	20	700	3	16,62	160,74	63,84
3	1	-1	0	50	200	3	20,46	176,25	68,00
4	1	1	0	50	700	3	21,25	184,83	84,40
5	0	-1	-1	35	200	1	19,31	166,67	75,97
6	0	-1	1	35	200	5	20,41	183,72	74,78
7	0	1	-1	35	700	1	17,82	188,17	80,41
8	0	1	1	35	700	5	22,24	164,22	76,08
9	-1	0	-1	20	450	1	15,01	167,59	72,51
10	1	0	-1	50	450	1	19,41	160,78	80,82
11	-1	0	1	20	450	5	15,09	146,27	64,20
12	1	0	1	50	450	5	22,58	183,41	76,34
13	0	0	0	35	450	3	17,25	187,72	91,92
14	0	0	0	35	450	3	17,36	188,84	94,67
15	0	0	0	35	450	3	17,33	187,96	94,58
16	0	0	0	35	450	3	18,24	186,75	94,70
17	0	0	0	35	450	3	17,73	187,20	95,92

Toutes les données de rendement de l'extrait de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* en utilisant les conditions MAAE ont été effectuées par plusieurs régressions correspondre à l'équation polynomiale du deuxième ordre comme l'équation suivante (7).

$$Y_{R\%} = 17,58 + 2,79 X_1 + 0,38 X_2 + 1,10 X_3 - 0,23 X_1X_2 + 0,77 X_1X_3 + 0,83 X_2X_3 - 0,62 X_1^2 + 1,31 X_2^2 + 0,06 X_3^2 \quad (7)$$

Les coefficients de régression estimés et l'ANOVA du rendement en extrait de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* ont été analysés par le BBD comme indiqué dans le tableau III-9.

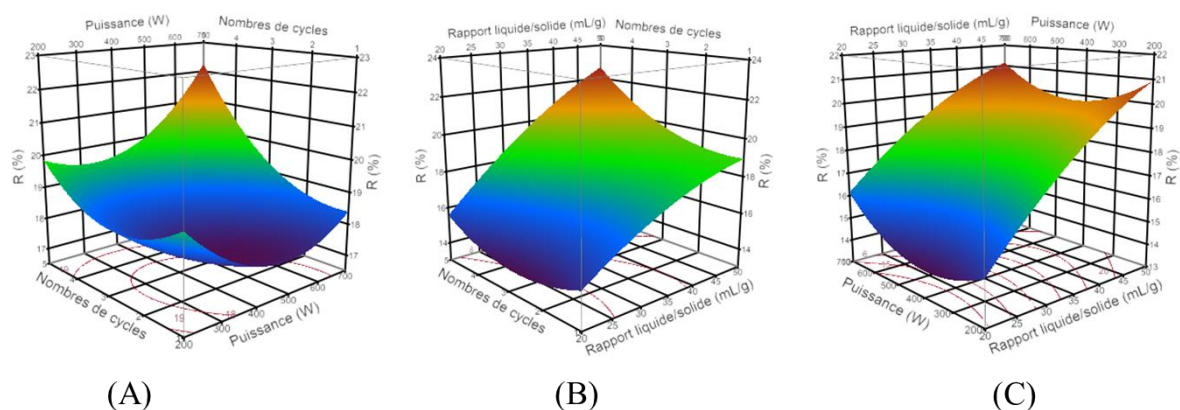
Le modèle de régression quadratique était significatif ( $p < 0,001$ ) et le manque d'ajustement n'était pas significatif ( $p > 0,05$ ) en même temps, montrant que notre modèle était en bon accord avec les données expérimentales du rendement. Le coefficient de régression ( $R^2 = 0,976$ ) a indiqué un bon ajustement entre les données de rendement expérimentales et prévues : une valeur  $R^2$  plus proche indique une meilleure corrélation. Les deux variables linéaires ( $X_1$  et  $X_3$ ), l'interaction entre le rapport liquide/solide et le nombre de cycles ( $X_1 * X_3$ ), l'interaction entre puissance et nombres de cycles et les deux termes quadratiques ( $X_2^2$  et  $X_3^2$ ) ont montré une différence significative ( $p < 0,05$ ), indiquant l'effet sur le rendement de l'extrait de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* avec les conditions MAAE.



**Tableau III-9 : Estimation des coefficients de régression pour le modèle polynomial quadratique et l'analyse de la variance pour le rendement, la teneur totale en phénoliques et en flavonoïdes de l'extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparés par MAAE.**

Paramètre	Coefficients estimés			Prob (P) > F		
	R	TPC	Flavonoïdes	R	TPC	Flavonoïdes
Intercepter	17,582	187,694	94,358			
X <sub>1</sub> (Rapport liquide/solide)	2,77875	8,1925	5,05125	<,0001	<,0001	<,0001
X <sub>2</sub> (Puissance)	0,375	0,77375	2,1725	0,1064	0,1724	0,008
X <sub>3</sub> (Nombres de cycles)	1,09625	-0,69875	-2,28875	0,0010	0,2124	0,0062
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	-0,27	3,2425	5,29	0,3770	0,0028	0,0004
X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>	0,7725	10,9875	0,9575	0,0307	<,0001	0,2905
X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>	0,83	-10,25	-0,785	0,0230	<,0001	0,3798
X <sub>1</sub> * X <sub>1</sub>	-0,61725	-13,5695	-13,24525	0,0626	<,0001	<,0001
X <sub>2</sub> * X <sub>2</sub>	1,30525	-2,387	-9,90275	0,0023	0,0114	<,0001
X <sub>3</sub> * X <sub>3</sub>	1,05775	-9,612	-7,64525	0,0068	<,0001	<,0001
Model				<,0001	<,0001	<,0001
Défaut d'ajustement (Lack of fit)				0,1464	0,0531	0,3048
R <sup>2</sup>				0,976	0,995	0,990

Les courbes de surface de réponse ont été tracées pour analyser l'interaction des variables et pour déterminer la condition optimale des réponses des variables indépendantes avec un rendement maximisé. À la base de l'équation (7), les valeurs de surface tridimensionnelles ont été tracées pour représenter les effets des variables de MAAE sur le rendement, qui sont illustrés sur la figure III-14. Le pourcentage du rendement de l'extrait a augmenté avec l'augmentation de la puissance et du nombre de cycles d'extraction, comme le montre la figure III-14A. Le rendement a également augmenté avec l'augmentation de rapport liquide/solide et le nombre de cycles, comme le montre la figure III-14 B. La figure III-14 C montre l'augmentation du rendement avec l'augmentation de la puissance et le rapport liquide/solide. Cependant, lorsque la puissance a été augmentée à près de 500W et le rapport liquide/solide a diminué à 20 mL/g, le rendement a diminué lentement.



**Figure III-14 : Surfaces de réponse de variables indépendantes d'extrait de la fleur d'*Opuntia ficus-barbaria* sur le pourcentage de rendement (R) par MAAE en utilisant un rapport liquide solide constant à 35 mL/g (A), en utilisant une puissance microonde constante au niveau de 450W (B) et en utilisant un nombre de cycles constant de 3 cycles (C).**

#### III.4.2. Effet des conditions d'extraction sur la teneur totale en phénols

Le contenu phénolique total (TPC) d'extrait de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparé dans différentes conditions des MAAE est indiqué dans le tableau III-8. Le TPC le plus élevé (188,84 mg EAG / g d'extrait) a été obtenu dans la condition numéro 14 avec un rapport liquide-solide de 35 mL/g, 450 w de puissance et trois cycles d'extraction. En revanche, la teneur phénolique totale la plus faible (146,27 mg GAE / g d'extrait) a été observée dans l'essai expérimental numéro 11 avec un rapport liquide/solide de 20 ml/g, 450 w de puissance et cinq cycles d'extraction.

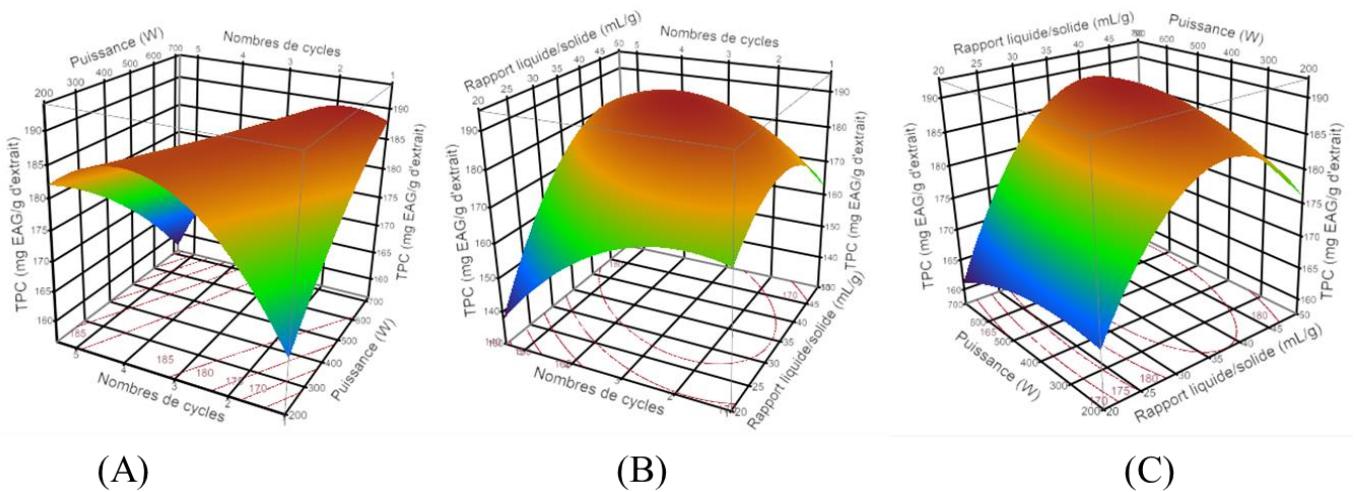
Les données expérimentales ont été affichées à l'aide d'un modèle polynomial de second ordre donné par l'équation suivante :

$$Y_{TPC} = 187,58 + 8,19 X_1 + 0,77 X_2 - 0,70 X_3 + 3,24 X_1 X_2 + 10,98 X_1 X_3 - 10,25 X_2 X_3 - 13,56 X_1^2 - 2,38 X_2^2 - 9,61 X_3^2 \quad (8)$$

Les coefficients de régression estimés et l'ANOVA du TPC analysés par BBD sont présentés dans le tableau III-8. Le modèle de régression quadratique était significatif ( $p < 0,001$ ) tandis que le manque d'ajustement n'était pas significatif ( $p > 0,05$ ). Les coefficients de régression ( $R^2 = 0,995$ ) donneraient un bon ajustement au modèle mathématique du TPC. Le rapport liquide/solide ( $X_1$ ), en tant que variable indépendante individuelle, affecte le TPC ( $p < 0,05$ ). Tous les termes quadratiques ( $X_1^2$ ,  $X_2^2$  et  $X_3^2$ ) et les coefficients d'interaction ( $X_1 * X_2$ ,  $X_1 * X_3$  et  $X_2 * X_3$ ) ont également une influence très significative ( $p < 0,05$ ). Les courbes

de surface de réponse ont été tracées afin d'analyser l'interaction entre les variables et de déterminer le niveau optimal de chaque variable pour un TPC plus élevé.

Des graphiques en trois dimensions pour le TPC en fonction des conditions d'extraction sont présentés sur la figure III-15. Les données ont été créées en gardant une variable au milieu des plages de test et en changeant les deux autres dans la plage expérimentale. Selon la figure III-15 A, l'augmentation de la puissance jusqu'à 600W a entraîné une augmentation de la teneur en polyphénols. Après cette puissance, la teneur en phénoliques était diminuer. Cet effet est probablement dû au processus d'extraction dépendant du nombre de cycles d'extraction qui a augmenté le TPC jusqu'à 3 cycles. Selon la figure III-15 B, les surfaces de réponse ont montré que le TPC augmentait avec l'élévation du rapport liquide/solide jusqu'à 40 mL/g. Cela pourrait être dû à l'amélioration du transfert de masse et de la solubilité à un rapport liquide/solide plus élevé. Selon la figure III-15 C, le TPC augmente lorsque le rapport liquide/solide et la puissance de l'irradiation augmentent. Cependant, lorsque le rapport liquide/solide dépasse 45mL/g, le TPC commence à diminuer lentement.



**Figure III-15 : Surfaces de réponse de variables indépendantes sur le contenu phénolique total (TPC) en mg AGE/g d'extrait de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* par MAAE en utilisant un rapport liquide solide constant à 35 mL/g (A), en utilisant une puissance microonde constante au niveau de 450W (B) et en utilisant un nombre de cycles constant de 3 cycles(C).**

### III.4.3. Effet des conditions d'extraction sur la teneur en flavonoïdes par HPLC

Les données expérimentales moyennes de la teneur totale en flavonoïdes par HPLC, à partir d'extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* préparées dans diverses conditions des MAAE, sont présentées dans le tableau III-8. Le moyen de la teneur en flavonoïdes la plus élevée (95,92 mg/g d'extrait) a été observé dans les essais expérimentaux central de 13 à 17 avec un rapport liquide-solide de 35 mL/g, 450 w de puissance et trois cycles d'extraction. La teneur en flavonoïdes la plus faible a été observée dans l'essai expérimental numéro 2 (63,84 mg/ g d'extrait) avec un rapport liquide/solide de 20 mL/g, 700 w de puissance et trois cycles d'extraction et dans l'essai expérimental numéro 11 (64,20 mg/ g d'extrait) avec un rapport liquide/solide de 20 mL/g, 500 w de puissance et cinq cycles d'extraction. Les teneurs en flavonoïdes de ces extraits aqueux, obtenu dans ces expériences, étaient évidemment supérieures à celui rapporté précédemment dans cette étude par les méthodes classiques.

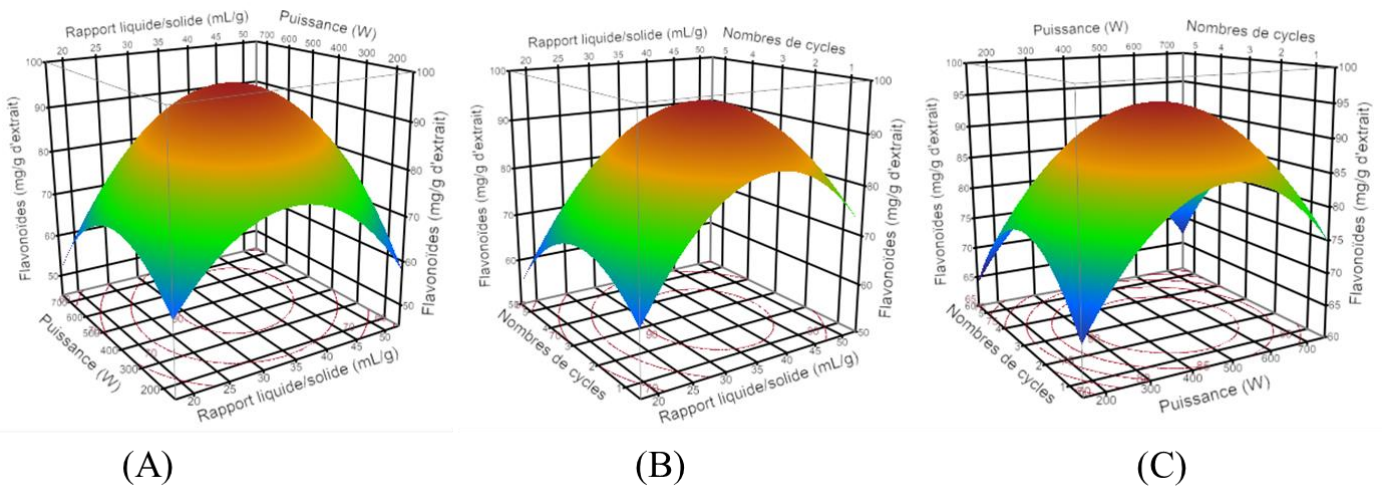
Les données expérimentales ont été analysées pour l'ajustement à l'équation de régression du deuxième ordre (équation 9).

$$Y_{Flavonoïdes} = 94,37 + 5,05 X_1 + 2,17 X_2 - 2,29 X_3 + 5,29 X_1 X_2 + 0,96 X_1 X_3 - 0,97 X_2 X_3 - 13,25 X_1^2 - 9,90 X_2^2 - 7,65 X_3^2 \quad (9)$$

Les coefficients de régression estimés pour le modèle polynomial quadratique et l'analyse de variance (ANOVA) de la teneur en flavonoïdes par BBD sont répertoriés dans le tableau III-9. Le coefficient de détermination ( $R^2 = 0,990$ ) indique une corrélation positive et forte entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites. De plus, la valeur de p pour le manque d'ajustement ( $p > 0,05$ ) et la valeur de p du modèle ( $p < 0,001$ ) indiquent et confirment que le modèle mathématique était un prédicteur fiable du teneur en flavonoïdes. Les trois variables indépendantes individuelles ( $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ ) sont révélées un effet sur la teneur en flavonoïdes ( $p < 0,05$ ). L'interaction entre le rapport liquide/solide et la puissance ( $X_1 * X_2$ ) s'est avère être la seule interaction qui affecte la teneur en flavonoïdes. Tous les termes quadratiques ( $X_1^2$ ,  $X_2^2$  et  $X_3^2$ ) ont également une influence très significative ( $p < 0,0001$ ) sur la teneur en flavonoïdes.

L'interaction de ces variables indépendantes a été tracée sur la surface de réponse de la courbe en trois dimensions en utilisant l'équation (9), comme le montre la figure III-16. La teneur en flavonoïdes de la puissance microonde moyenne combinée à un nombre de cycle moyen était supérieure à celle d'une puissance microonde faible ou élevée et d'un nombre de cycles bas ou élevé. À 35 mL/g, la teneur en flavonoïdes augmentait lorsque le nombre de

cycles d'extraction passait de 1 à 3 cycles et la puissance augmentait de 200 à 500 W. Cependant, une diminution rapide de la teneur en flavonoïdes a été observée après avoir augmenté le nombre de cycles d'extraction à 5 cycles et augmenté la puissance supérieure à 700 W. Cela démontre clairement que les flavonoïdes sont dégradés par la puissance et le nombre de cycles d'extraction dans le processus des MAAE.



**Figure III-16 : Surfaces de réponse de variables indépendantes sur les flavonoïdes en mg/g d'extract de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* par MAAE en utilisant un rapport liquide solide constant à 35 mL/g (A), en utilisant une puissance microonde constante au niveau de 450W (B) et en utilisant un nombre de cycles constant de 3 cycles(C).**

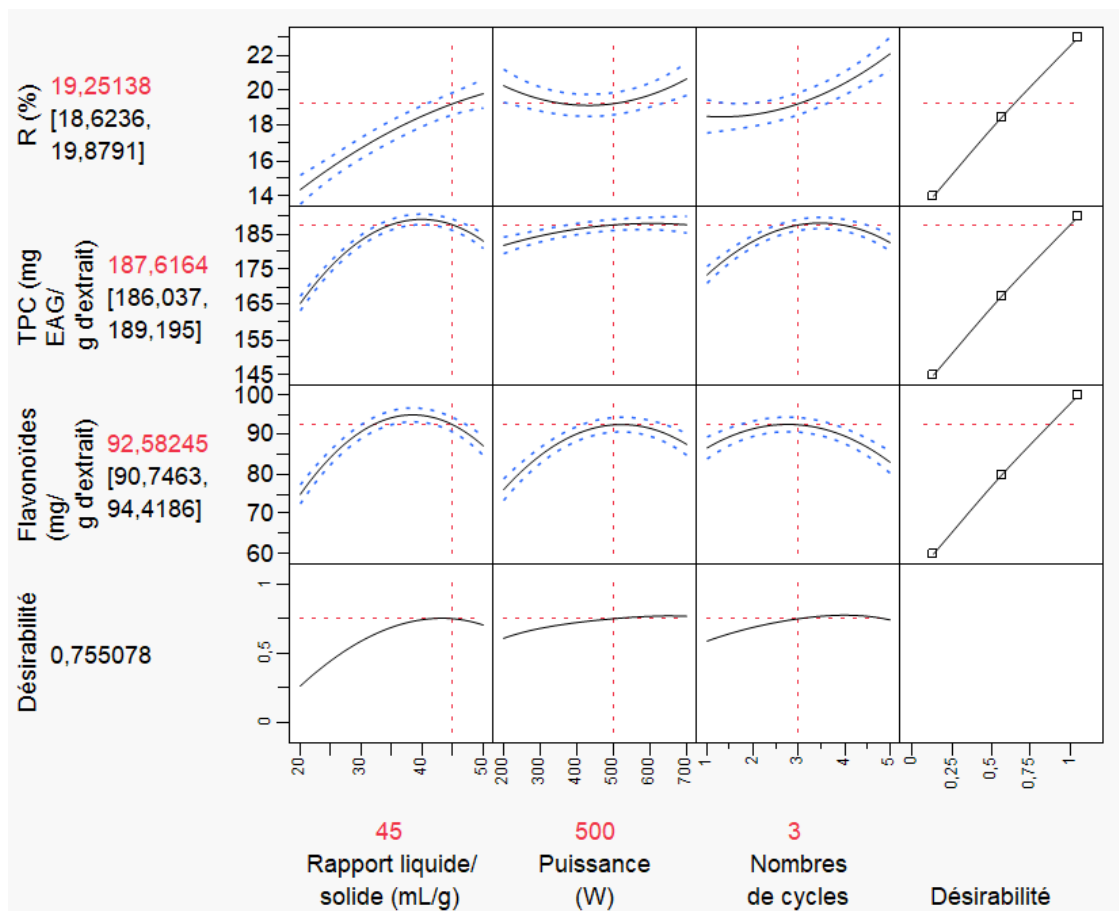
#### III.4.4. Vérification des conditions optimales prédictives

Les conditions optimales obtenues en utilisant le modèle étaient les suivantes : rapport liquide/solide 45 mL/g, puissance 500 W et 3 cycles d'extraction. Dans des conditions optimales, les valeurs de réponse maximale de rendement (19,7%), de TPC (187,62 mg EAG/g d'extract) et des flavonoïdes (92,58 mg/g d'extract) ont été prédites par le modèle. Des expériences de vérification ont été effectuées dans les conditions prévues. Le résultat a montré que les valeurs expérimentales étaient cohérentes avec les valeurs prédictives (Figure III-17 et Tableau III-10). Le rendement obtenu était de 20,52%, le TPC obtenu était de  $189,72 \pm 0,79$  mg GAE/g d'extract et les flavonoïdes étaient de  $96,72 \pm 3,09$  mg/g d'extract. La bonne corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales a démontré que la méthodologie de surface de réponse est précise et fiable pour trouver les conditions optimales d'extraction par microonde pour les antioxydants des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*.

**Tableau III-10 : Données expérimentales de validation des valeurs prédites dans des conditions d'extraction optimales de MAAE.**

Dependent Variable	Predicted value	Experimental Value	% Difference (CV)
R (%)	19,25	20,52 ± 0,65	4,51
TPC (mg EAG/g d'extrait)	187,62	189,72 ± 4,77	0,79
Flavonoïdes (mg/g d'extrait)	92,58	96,72 ± 4,95	3,09

Les valeurs sont la moyenne ± l'écart type (n = 3), CV = coefficient de variation



**Figure III-17 : Diagramme 2D des effets des paramètres d'extraction MAAE sur R, TPC et Flavonoïdes.**

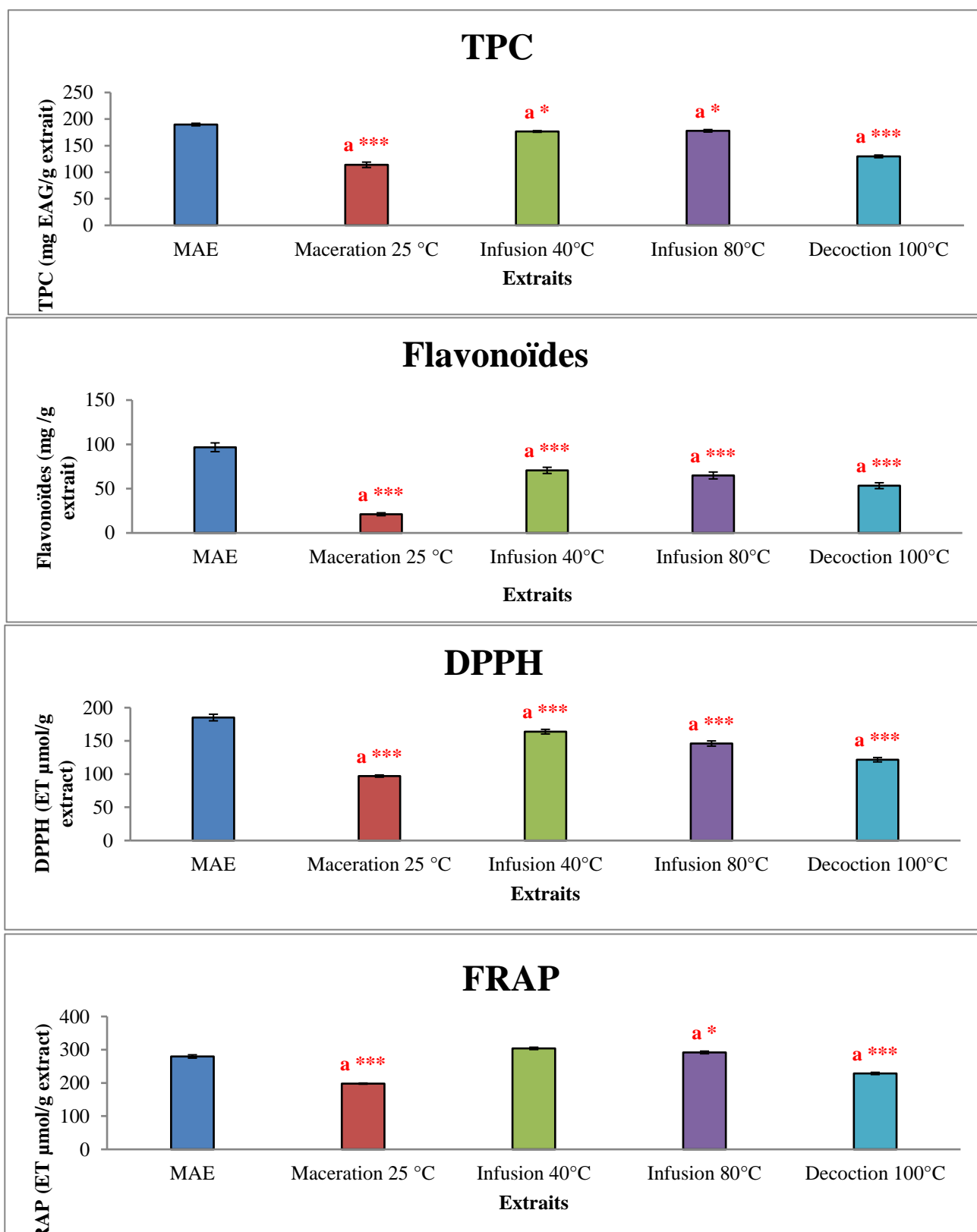
### III.4.5. Evaluation de la dégradation potentielle des molécules

#### III.4.5.1. Comparaison de la MAAE à d'autres techniques d'extraction

Dans le but d'évaluer l'influence du chauffage à haute température et l'influence de l'irradiation microondes sur la dégradation des molécules, la MAAE a été comparée à des techniques d'extraction classiques : macération, infusion à 40 et 80 °C et décoction. La figure III-18 compare la composition phénolique totale, les flavonoïdes et l'activité antioxydante entre les différentes techniques d'extraction mentionnées ci-dessus.

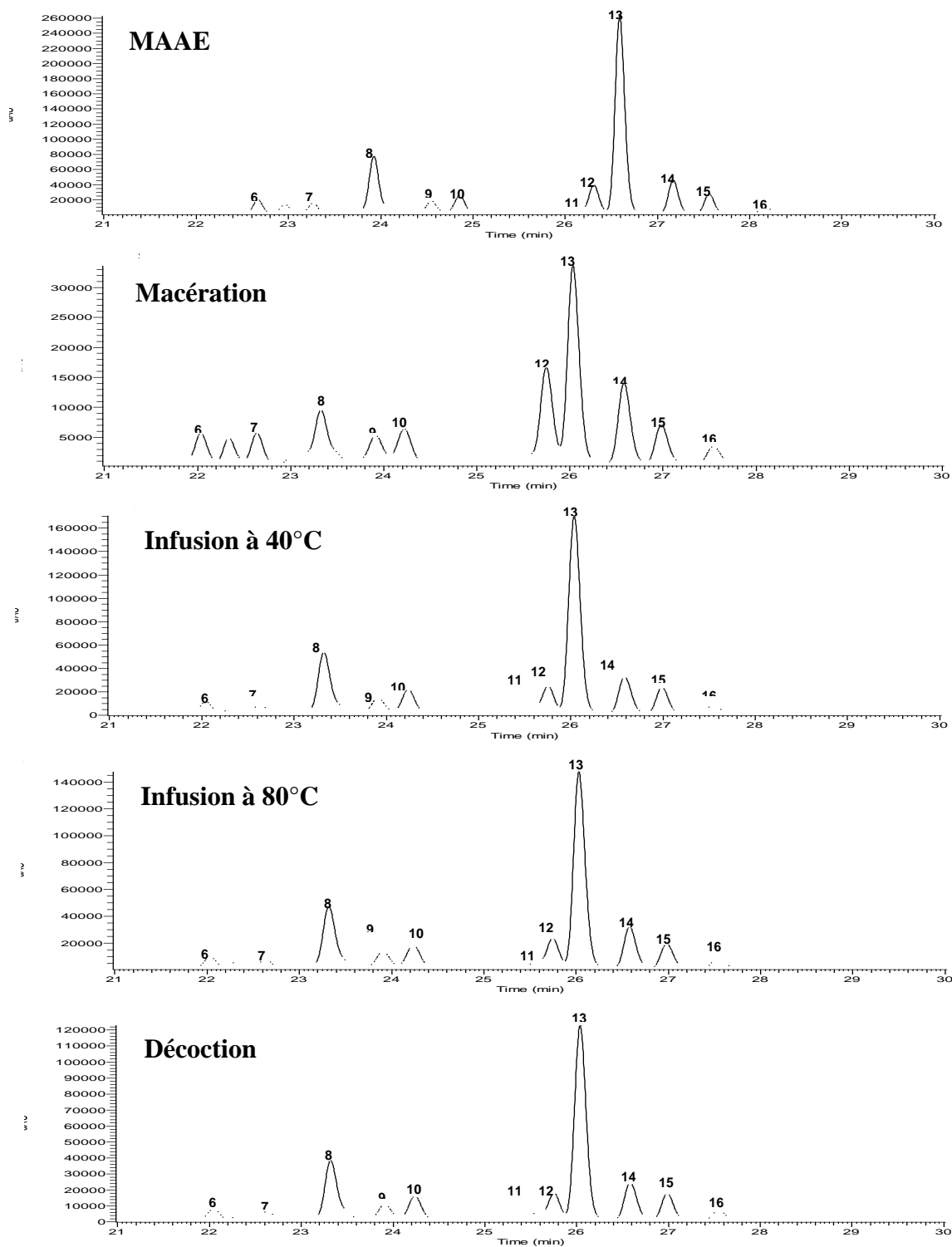
L'extrait de la technique MAAE est significativement le plus riche en composés phénoliques ( $p < 0,05$ ) et en flavonoïdes ( $p < 0,0001$ ) et le plus actif, lorsque seul le test du DPPH est pris en compte ( $p < 0,0001$ ), par rapport aux autres techniques. Cependant aucune différence significative, n'a été remarquée entre la MAAE et l'infusion à 40°C lorsque l'activité antioxydante a été évaluée par le test FRAP. Il peut être également remarqué que la MAAE, l'infusion à 40°C et l'infusion à 80°C ont toujours une réponse plus élevée que la décoction et la macération. Cela peut être expliqué par le fait que ces trois techniques induisent une libération des molécules bioactives de façon plus importante avec une élévation légère de la température suivie par une étape de refroidissement.

Par ailleurs les chromatogrammes correspondants aux extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* obtenus avec ces différentes techniques (Figure III-19) illustrent bien le rendement d'extraction. L'abondance relative des pics chromatographiques est plus importante pour la MAAE suivi de l'infusion et de la décoction, alors que la macération présente une abondance relative beaucoup plus faible. En comparant les profils chromatographiques il peut être remarqué que ceux-ci sont similaires entre 20 et 40 min, et que l'utilisation d'une source de chauffage suivi par une étape de refroidissement induit l'extraction des flavonoïdes glycosylés. L'extraction de ces molécules peut être due à une thermo-dégradation de molécules glycosylées en aglycones.



**Figure III-18 : Histogrammes comparatifs obtenus entre différentes techniques d'extraction pour le TPC (A), les flavonoïdes (B), le test DPPH (C) et le test FRAP (D). a statistiquement significatif par rapport à la MAE à différents niveaux de confiance 99.9 % \*\*\*, 99 % \*\* et 95 % \*, n = 3.**





**Figure III-19 : Chromatogrammes d'extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* obtenus par MAAE, infusion à 40°C, décoction et macération. Colonne Acclaim Polar Advantage C18 (diamètre intérieur 4,6 ; longueur 250 mm ; 5 µm) ; gradient constitué de l'eau ultra-pure acidifié à 2,5% CH<sub>3</sub>COOH et de l'acétonitrile pure ; débit de 1 mL/min ; injection de 10 µL ; λ = 366 nm ; T = 25°C.**

### III.4.5.2. Etude de la stabilité de quercétin-3-O-rutinoside

Afin de vérifier la stabilité des molécules glycosylées, nous avons simulé le processus d'extraction en effectuant trois cycles d'extraction sur la molécule glycosylée « quercétin-3-O-rutinoside » présente dans la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* [21,22,26,28].

Cette molécule a été dissoute dans un mélange H<sub>2</sub>O : MeOH (90:10) à une concentration de 0.5 mg/mL, puis soumise à trois cycles d'irradiation micro-ondes successifs (1min, 500W) avec une étape de refroidissement entre chaque cycle. Après chaque cycle, un prélèvement de la solution a été injecté en HPLC en même conditions précédemment décrite (partie III-3.). Ensuite, le pourcentage de recouvrement de quercétine-3-O-rutinoside a été calculé en prenant en compte l'aire de pic avant et après irradiation à la micro-onde.

La figure III-20 montre que l'application répétée de plusieurs cycles d'extraction à 500 W pendant une minute a peu d'effet sur la récupération de la molécule étudiée. La quantité de quercétin-3-O-rutinoside n'a pas été affectée par la répétition de trois cycles d'extraction. De plus, l'empreinte chromatographique obtenue après chaque cycle n'a pas montré l'hydrolyse de la molécule glycosylée en aglycone. Ces résultats indiquent que dans nos conditions d'extraction assistée par microonde, les flavonols glycosylés ne se sont pas dégradés de manière significative.

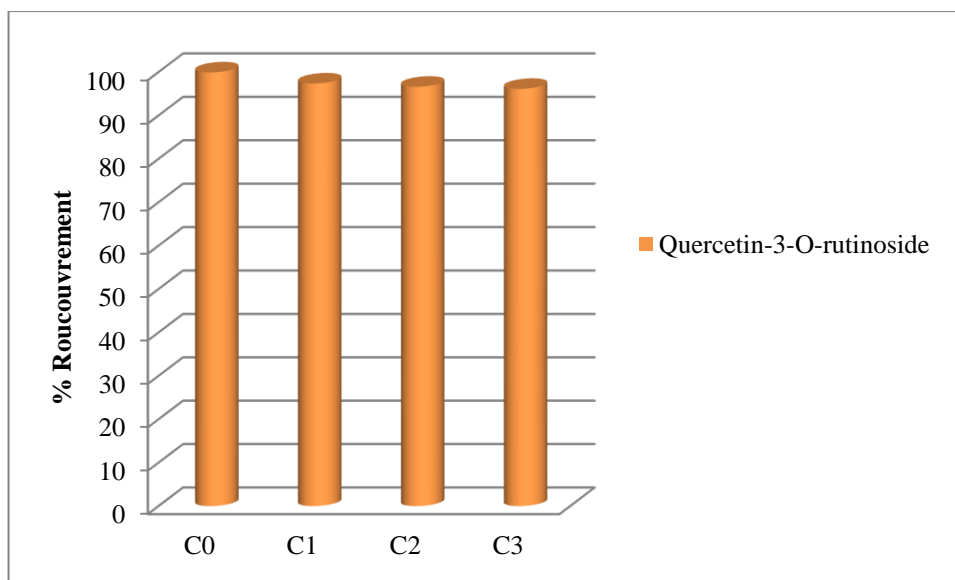


Figure III-20 : Pourcentage de recouvrement de quercétine-3-O-rutinoside avant (C0) et après les trois cycles d'irradiation microondes (C1-C3)

Nos résultats correspondent aux résultats de Biesaga [44], il a étudié l'effet de l'extraction assistée par microonde sur la stabilité de différents types de flavonoïdes et a prouvé que les molécules les plus stable le rayonnement microondes sont les flavonols glycosylés.

Par conséquent, il n'y a pas de dégradation significative des flavonoïdes glycosylés par la température, et l'extraction par microondes est due à l'effet combiné de la température, de la pression et des microondes, ce qui expliquerait l'augmentation significative de la teneur des flavonoïdes de l'extrait MAAE.

### III.5. Interprétation des résultats obtenus par les méthodes statistiques descriptives pour différents extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*

Les méthodes statistiques ont été réalisées avec SPSS. Dans notre étude, les p variables sont les différentes méthodes d'extraction et les n observations correspondent au pourcentage de différents moyens de dosages des composés phytochimiques et activité antioxydante obtenus pour les fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*.

#### III.5.1. Distinction entre les méthodes d'extraction

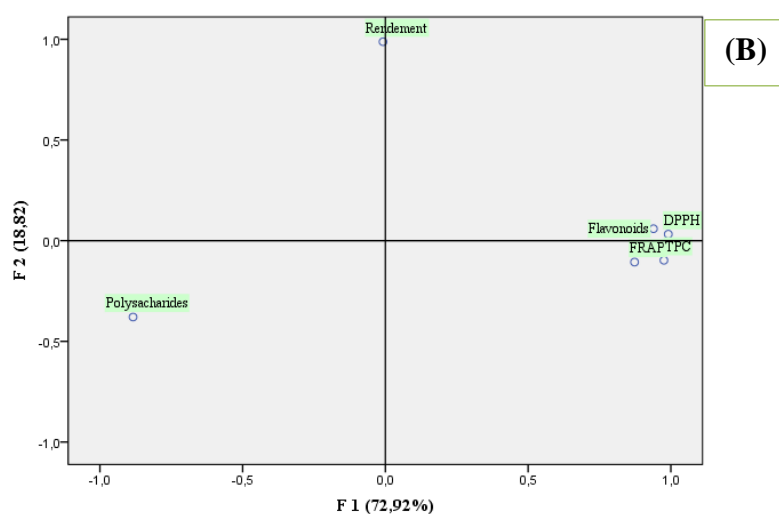
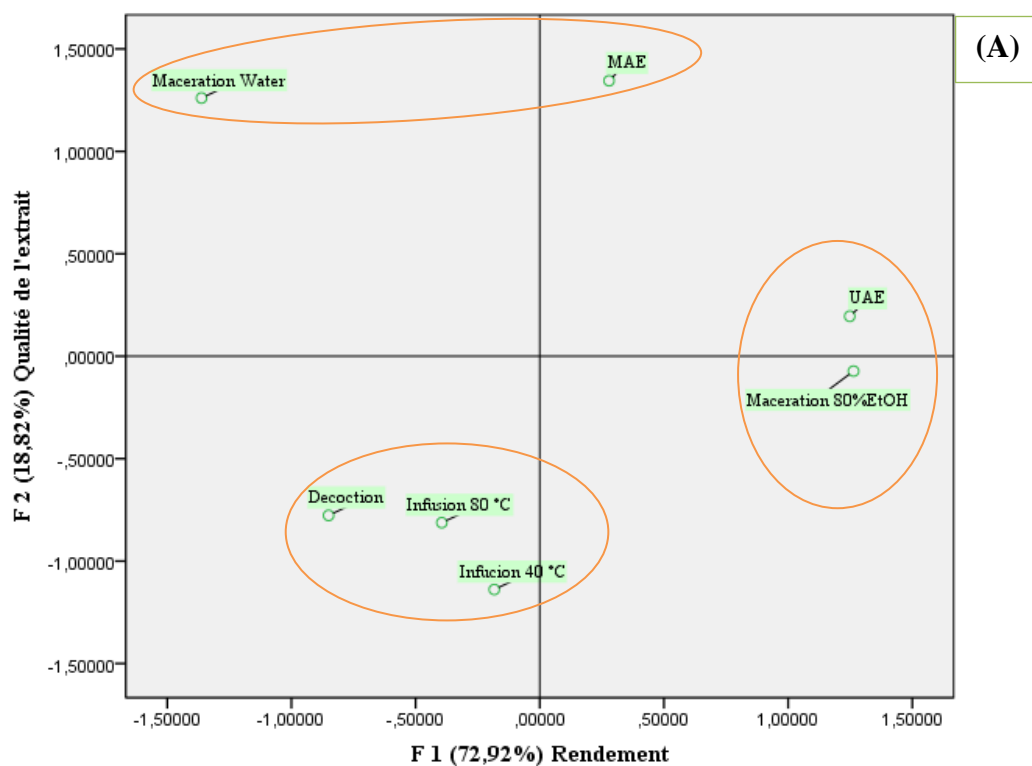
##### III.5.1.1. Traitement de l'ensemble des données

La figure III-21 montre l'ACP réalisée sur l'ensemble des observations obtenus sur les différents dosages des molécules bioactives, l'activité antioxydant (DPPH et FRAP) et le rendement de l'extrait sec de notre plante et prenant en compte les différentes méthodes, la nature de solvants (aqueux et hydro-éthanoliques), le temps et la température de l'extraction. Dans notre cas les deux axes principaux (F1 et F2) décrivent 91,74% de la variance total des observations (fig. X). Les interprétations obtenues à partir de cette ACP sont bien significatives et les tendances à fournir des valeurs bien surestimées aux valeurs de référence. En effet, au moins 6 composantes principales sont nécessaires pour décrire plus de 90% la variance du système. On peut conclure que les dosages des polyphénols, flavonoïdes, et polysaccharides, les activités antioxydants (DPPH et FRAP) et le rendement de l'extraction sont bien choisis puisqu'ils produisent des informations peu corrélées. Le calcul de la matrice des corrélations permet d'analyser les relations bilatérales existant entre les différentes variables retenues (tableau III-11). La matrice permet d'observer la relation positive forte entre la qualité de l'extrait et le rendement de l'extraction, de constater les relations négatives entre les variables de dosage des antioxydants et le dosage des polysaccharides.

**Tableau III-11 : Matrice des corrélations entre les différentes variables obtenues avec le coefficient de corrélation de Pearson.**

Variables	TPC	Flavonoïdes	DPPH	FRAP	Polysaccharides	Rendement
TPC	<b>1,000</b>	0,920	0,965	0,823	-0,810	-0,100
Flavonoïdes	0,920	<b>1,000</b>	0,891	0,696	-0,882	0,022
DPPH	0,965	0,891	<b>1,000</b>	0,890	-0,884	0,030
FRAP	0,823	0,696	0,890	<b>1,000</b>	-0,645	-0,053
Polysaccharides	-0,810	-0,882	-0,884	-0,645	<b>1,000</b>	-0,326
Rendement	-0,100	0,022	0,030	-0,053	-0,326	<b>1,000</b>

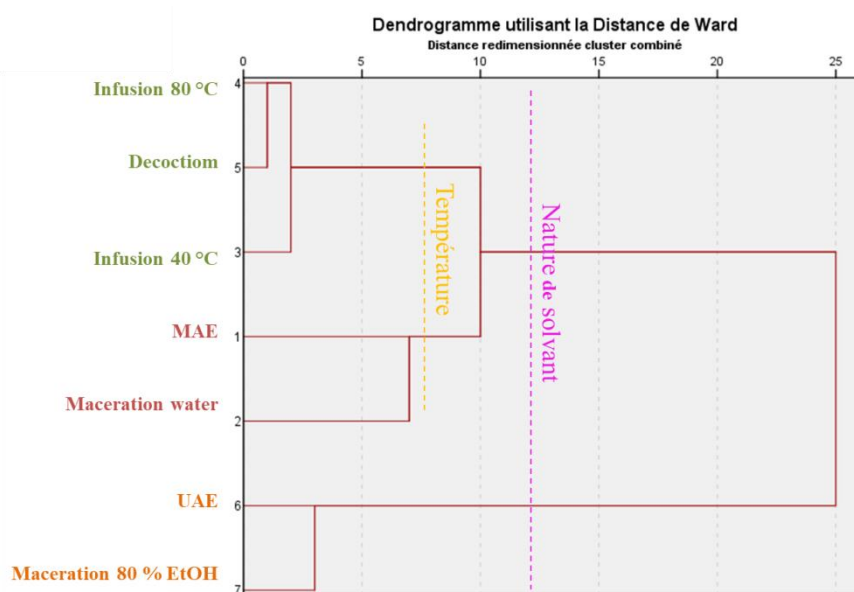
La matrice permet d'observer la relation positive forte entre la qualité antioxydante de l'extrait et les conditions de l'extraction de MAE et UAE, de constater les relations négatives entre ces variables et la méthode d'extraction.



**Figure III-21 : Analyse en composantes principales basée sur le moyen de dosage des composés phytochimiques, l'activité antioxydante (DPPH et FRAP) et le rendement obtenu sur différentes méthodes d'extractions. (A) graphique d'observation, (B) graphique des variables.**

La figure III-21-B montre comment les six variables initiales sont corrélées avec les deux facteurs obtenus. On peut voir que le facteur F1 est corrélé avec TPC, flavonoïdes, activité antioxydant et polysaccharides, alors que F2 est corrélé avec le rendement.

En combinant les informations données par les deux graphiques de la figure III-21, on peut en conclure que la composante F1 est principalement associée au rendement de l'extraction et la composante F2 se distingue essentiellement à la qualité de l'extrait par son TPC, flavonoïdes, activité antioxydant et polysaccharides. A partir du graphique des observations (Figure III-21-A) il peut être séparé trois groupes de méthodes d'extraction, le groupe UAHE et macération 80% EtOH, le groupe MAE et macération de l'eau, et le groupe infusion 40 °C, infusion 80 °C et décoction. Les ellipses qui entourent ces groupes de méthodes d'extraction ont été placées en tenant compte de la CAH suivante (Fig. III-22).



**Figure III-22 : Dendrogramme de la CAH réalisé à partir des moyens de dosage des composés phytochimiques, l'activité antioxydante (DPPH et FRAP) et le rendement obtenu pour les différentes méthodes d'extractions.**

La réalisation d'une CAH, en prenant en compte le carré de la distance euclidienne entre groupes, sur les observations obtenues à différentes conditions d'extraction permet de diviser (à un niveau de confiance de 95 %) les extraits testés en trois groupes distincts (Figure III-22). Le premier groupe constitué d'extraits de l'infusion à 40 °C et à 80 °C et de la décoction à 100 °C, le deuxième groupe constitué d'extraits de MAE et de macération avec l'eau à 25 C, et le troisième groupe constitué d'extraits de UAE et de macération avec 80% d'éthanol à 25 °C. Ces résultats confirment l'ACP précédemment illustrée (Figure III-21) avec une importante dissimilarité entre les méthodes aqueuses à température ambiante ou supérieur à 40 °C d'une part et les méthodes hydro-éthanoliques à température ambiante d'autre part.

En conclusion de l'étude statistique, il s'avère que les résultats de la qualité d'extrait sont très variables d'une méthode à une autre. Néanmoins, d'après cette étude, trois groupes

de méthodes se différencient : le groupe de UAE et macération 80% EtOH, le groupe MAE et macération de l'eau, et le groupe infusion 40 °C, infusion 80 °C et décoction, avec une qualité d'extrait du premier groupe qui s'avère être plus élevée que celle du deuxième et troisième groupe. De même l'effet de la nature du solvant d'extraction est fortement soumis une différence significative a pu être dégagée une tendance des extraits hydroalcoolique à être plus actifs que les extraits aqueux. De plus, le lien entre l'utilisation des méthodes innovantes (UAHE pour extraction hydroalcoolique et MAAE pour extraction aqueux) et la qualité de l'extrait a pu être mis en évidence.

A partir des résultats de cette étude exploratoire nous avons pu retenir les variables de notre domaine pour une étude plus approfondie. La détermination du pouvoir antimicrobien et l'investigation phytochimique seront réalisés à partir d'extraits de MAAE et UAHE de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* qui présentent une qualité d'extraction intéressante et l'intérêt de n'avoir été que très peu étudiés sur cette fleur jusqu'à présent. Enfin, la nature de solvant, aqueux utilisé pour MAAE et hydroalcoolique utilisé pour UAHE, induit une bonne qualité phytochimiques, une activité antioxydante et un rendement d'extraction élevés que ceux obtenus avec les méthodes conventionnelles. De plus l'utilisation de l'eau ou un mélange l'eau et EtOH comme solvant d'extraction biodégradable et non toxique va nous permet de rester dans l'approche d'extraction « verte » développée dans cette thèse.

### III.6. Bioactivité et investigation phytochimique des extraits UAHE et MAAE de la fleur *Opuntia ficus-barbarica*

#### III.6.1. Rendement des fractions de l'extraction liquide-liquide (ELL) des extraits bruts UAHE et MAAE

Les rendements d'extraction sont exprimés en pourcentage de la masse d'extrait obtenue par rapport à la masse d'extrait brut et sec (Tableau III-12). On peut notamment remarquer que les meilleurs rendements ont été obtenus avec les fractions aqueuses ( $F_{Aq}$ ) suivi des fractions d'acétate d'éthyle ( $F_{AE}$ ) et fraction d'hexane ( $F_H$ ). La variation du rendement entre les différentes fractions démontre que les extraits contiennent des molécules couvrant une large gamme de polarité et que les composants ont bien été partagés entre les trois fractions selon leurs affinités dans les solvants.

**Tableau III-12 : Pourcentage massique (%) et couleur des fractions obtenues après le fractionnement ELL des extraits bruts UAHE et MAAE.**

Extraits		Pourcentage massique (%)	Couleur
UAHE	$F_H$	15,62%	Jaunâtre
	$F_{AE}$	19,59%	Jaune foncé
	$F_{Aq}$	60,33%	Marron
MAAE	$F_H$	4,21%	Blanc
	$F_{AE}$	11,24%	Jaune
	$F_{Aq}$	80,91%	Marron

$F_H$  : Fraction hexane ;  $F_{AE}$  : Fraction acétate d'éthyle,  $F_{Aq}$  : Fraction aqueuse

#### III.6.2. Activité antimicrobienne

Pour caractériser l'activité antimicrobienne des extraits bruts UAHE et MAAE et de ses fractions ( $F_H$  ;  $F_{AE}$  et  $F_{Aq}$ ), nous avons utilisé préférentiellement des souches pathogènes de l'homme et d'origine connue, c'est-à-dire identifiées avec un numéro ATCC : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.* et *Staphylococcus aureus*.



**Tableau III-13 : Effet des extraits bruts et ses fractions sur la croissance de quatre souches bactériennes exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.**

Extraits	Concentration (µg/mL)	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa	Enterococcus sp.	Staphylococcus aureus
UAHE brut	100	8,0±0	10±0	10,66±0,66	10,58±0,30
	400	9,66±0,33	10,3±0,33	13,66±0,33***	11,5±0,50
	600	12,1±1,0***	10,83±0,16	15,0±0,57***	12,33±0,33**
UAHE F <sub>H</sub>	50	7,5±0,5	7,25±0,25	7,25±0,25	9,5±0,5
	100	7,75±0,25	7,5±0,5	7,75±0,25	11,5±0,5
	200	8,16±0,16	8,5±0,5	8,66±0,16	13,0±0***
	400	9,25±0,25	9,25±0,25	9,25±0,25	14,5±0,5***
UAHE F <sub>AE</sub>	50	8,5±0,28	11,75±0,25	8,0±0,57	9,33±0,33
	100	9,33±0,33	12,83±0,44**	8,66±0,33	10,16±0,44
	200	9,66±0,33	14,3±0,33***	10,33±0,66	10,33±0,33
	400	11,66±0,33	14,66±0,33***	10,66±0,33	13,5±0,5***
UAHE F <sub>Aq</sub>	50	8,0±0	8,25±0,25	9,0±1,0	9,33±0,33
	100	9,66±0,66	8,6±0,33	11,5±0,5	9,66±0,33
	200	10,83±0,44	9,5±0,5	11,0±1,0	10,83±0,16
	400	12,33±0,33***	11,16±0,16	11,66±0,33	12,33±0,33**
MAAE brut	100	7,66±0,33	8,25±0,25	9,66±0,66	9,5±0,5
	400	8,0±0	10,5±0,5	11,33±0,33	10±0,57
	600	12,0±1,0***	13,75±0,25***	13,33±0,33**	10,66±0,33
MAAE F <sub>H</sub>	50	6,0±0	7,75±0,25	6,0±0,0	8±0
	100	6,0±0	8,5±0,28	6,33±0,16	9,88±0,13
	200	6,0±0	8,75±0,25	6,75±0,25	11,75±0,25
	400	6,0±0	10,25±0,25	7,25±0,25	11,5±0,29
MAAE F <sub>AE</sub>	50	7,0±0	10,6±0,33	8,5±0,5	9,67±0,33
	100	7,5±0,5	11,0±0	9,25±0,25	9,33±0,88
	200	8,5±0,5	11,6±0,33	10,0±0,0	10,33±0,33
	400	9,0±0	11,5±0,5	12,33±0,88**	11,5±0,5
MAAE F <sub>Aq</sub>	50	7,0±0	10,75±0,25	10,0±1,0	8±0
	100	7,25±0,25	11,25±0,25	11,5±0,5	8,67±0,33
	200	8,25±0,25	12,5±0,5**	11,66±0,66	9,33±0,33
	400	8,75±0,25	13,5±0,5***	13,66±0,33***	10,33±0,33
Kanamycine	30	21,00	20,50	6,00	32,50
Erythromycine	15	17,00	6,25	6,00	8,00
Lincomycine	2	19,00	6,00	11,00	8,00
Ampicilline	10	7,50	6,50	11,00	24,00
Ticarcillin/calvulanic acid 7.5:1 (TIM)	85	12,00	6,50	11,00	30,50
Oxacilline	5	6,00	7,00	-	29,00

Diamètre de la zone d'inhibition incluant le diamètre du disque de 6 mm. \*\*\* statistiquement significatif au niveau de confiance de 99.9 %. F<sub>H</sub>, Fraction hexane ; F<sub>AE</sub>, Fraction acétate d'éthyle, F<sub>Aq</sub>, Fraction aqueuse.

Le tableau III-13 donne les diamètres de la zone d'inhibition (y compris le diamètre du disque) des extraits bruts et des fractions vis-à-vis de ces souches obtenues à plusieurs concentrations en extrait ou fraction (50, 100, 200, 400 and 600 µg/mL) mais nous n'avons pas pu déterminer de valeurs CMI, car aucune de ces concentrations n'a mené à une inhibition totale de 100 %. Les extraits et fractions ont donc été comparés en fonction de leur capacité à inhiber la croissance des micro-organismes.

Les extraits bruts UAHE et MAAE et la fraction aqueuse de l'extrait UAHE ont présenté une activité inhibitrice intéressante contre l'*Escherichia coli* à une concentration de 400µg/mL. Par ailleurs, la résistance est totale à toutes les différentes concentrations de la fraction aqueuse de MAAE.

*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.* et *Staphylococcus aureus* sont sensible à la majorité des extraits étudiés, la fraction UAHE d'acétate d'éthyle à 200 µg/mL et à 400 µg/mL, l'extrait brute de MAAE à 600 µg/mL et la fraction MAAE aqueuse à 400 µg/mL ont tous montré une activité avec une zone d'inhibition hautement significatifs face à *Pseudomonas aeruginosa*. L'extrait UAHE brut présente une activité antibactérienne plus marquée vis-à-vis de l'*Enterococcus sp.* (15mm), alors que le diamètre d'inhibition de l'ampicilline vers cette souche est de 11 mm. Il peut être noté par ailleurs que l'activité inhibitrice des extraits bruts, vis-à-vis de *Enterococcus sp.*, se retrouve faible dans les trois fractions. Cette perte d'activité peut être due à la séparation, dans les différentes fractions, des molécules qui agissaient de manière synergique dans les extraits bruts. Les fractions obtenues à partir de l'extrait brut UAHE présentent une activité marquée pour *Staphylococcus aureus*. En revanche, cette inhibition reste inférieure à celle du contrôle positif (32 mm pour la kanamycine (30 µg / disque)).

### **III.6.3. Activité antioxydante**

L'activité antioxydante des extraits bruts UAHE et MAAE et ses fractions a été étudiée en évaluant leur pouvoir réducteur et leur capacité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH et FRAP. Les résultats sont représentés dans le tableau III-14 ainsi que dans la figure III-23. L'activité antioxydante pour l'extrait brut UAHE obtenue avec les deux tests DPPH et FRAP est significativement supérieure à celle obtenue pour l'extrait brut de MAAE ( $p < 0,0001$ ).

En ce qui concerne les différentes fractions, elles présentent toutes une activité antioxydante avec les deux tests. Cependant, l'activité antioxydant de la fraction F<sub>AE</sub> est la plus élevée quel que soit la méthode de préparation de l'extrait brute. L'activité de la fraction

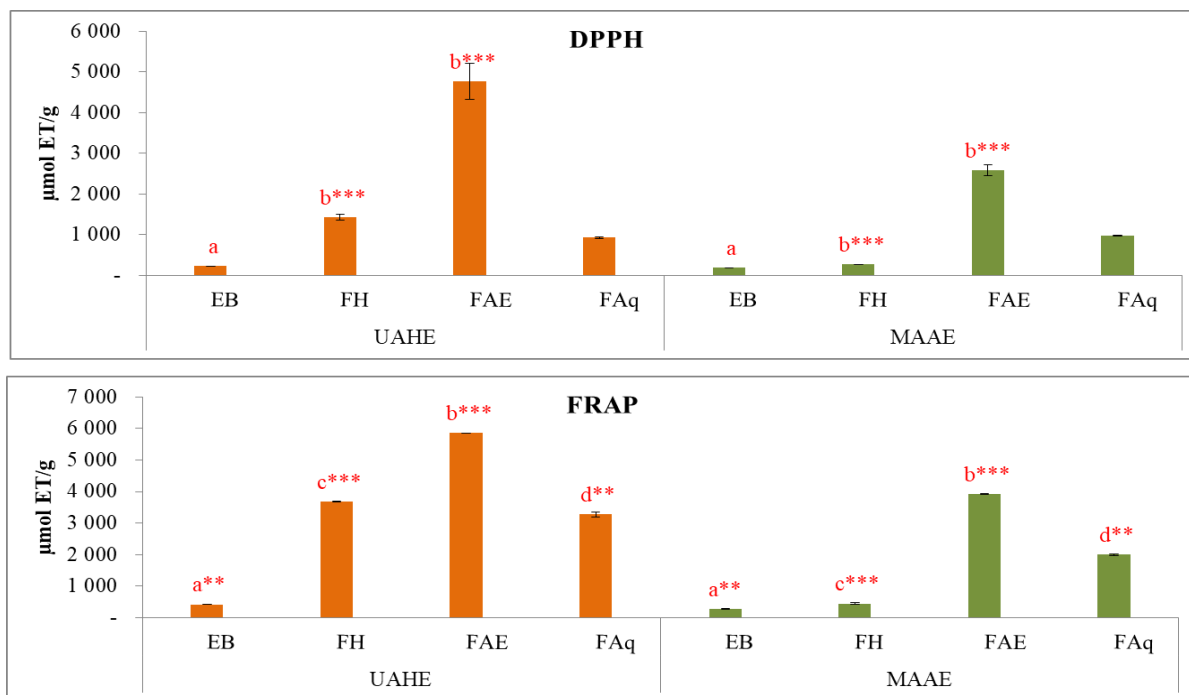
$F_{AE}$  est significativement plus active que  $F_H$  (DPPH :  $P <$  ; FRAP :  $p <$ ) et  $F_{Aq}$  (DPPH :  $P <$  ; FRAP :  $p <$ ). La capacité antioxydante de la fraction  $F_{Aq}$  est la plus faible pour l'extrait UAHE et la fraction  $F_H$  est la plus faible pour l'extrait MAAE.

L'activité antioxydante des extraits bruts, comme l'activité antimicrobienne, se retrouvent après fractionnement dans la fraction d'acétate d'éthyle, ce qui explique que les activités mises en évidence dans les différents extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* seraient dues à la présence de composés phytochimiques tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes présentés dans nos résultats précédents. L'extrait le plus efficace vis-à-vis des micro-organismes étudiés semble être le même extrait qui possède la meilleure activité antioxydante pour *Opuntia ficus-barbarica*, ce qui nous permet de conclure que la concordance de ces deux propriétés biologiques est le résultat de la richesse extraire en composés bioactifs.

Par ailleurs, les deux extraits bruts UAHE et MAAE de départ présentent une activité moindre par rapport aux extraits fractions, suggérant un effet de concentration des molécules actives présentes dans l'extrait brute.

**Tableau III-14 : Activité antioxydante ( $\mu\text{mol ET/g}$  extrait) des extraits brutes UAHE et MAAE, et des fractions obtenues avec les tests DPPH et FRAP**

Extraits	DPPH		FRAP	
	$(\mu\text{mol ET/g}$ extrait)		$(\mu\text{mol ET/g}$ extrait)	
UAHE	EB	222,46	420,79	
	$F_H$	1 427,04	3 687,46	
	$F_{AE}$	4 767,92	5 854,17	
	$F_{Aq}$	925,80	3 273,30	
MAAE	EB	185,18	279,64	
	$F_H$	260,00	450,03	
	$F_{AE}$	2 576,98	3 925,85	
	$F_{Aq}$	962,90	1 994,05	



**Figure III-23 : Activité antioxydante des extraits bruts et des fractions obtenus avec le test DPPH et le test FRAP. a** significativement différent des extraits bruts de UAHE et de MAAE et **b** significativement différent des fractions FAE, **c** significativement différent des fractions FH et **d** significativement différent des fractions FAq de l'extrait brut correspondant. \*\*\* statistiquement significatif au niveau de confiance de 99.9 %. FH, Fraction hexane ; FAE, Fraction acétate d'éthyle, FAq, Fraction aqueuse.

### III.6.4. Caractérisation phytochimique par HPLC :

#### III.6.4.1. Identification des molécules présentes dans les fractions (F1-F3) des extraits UAHE et MAAE

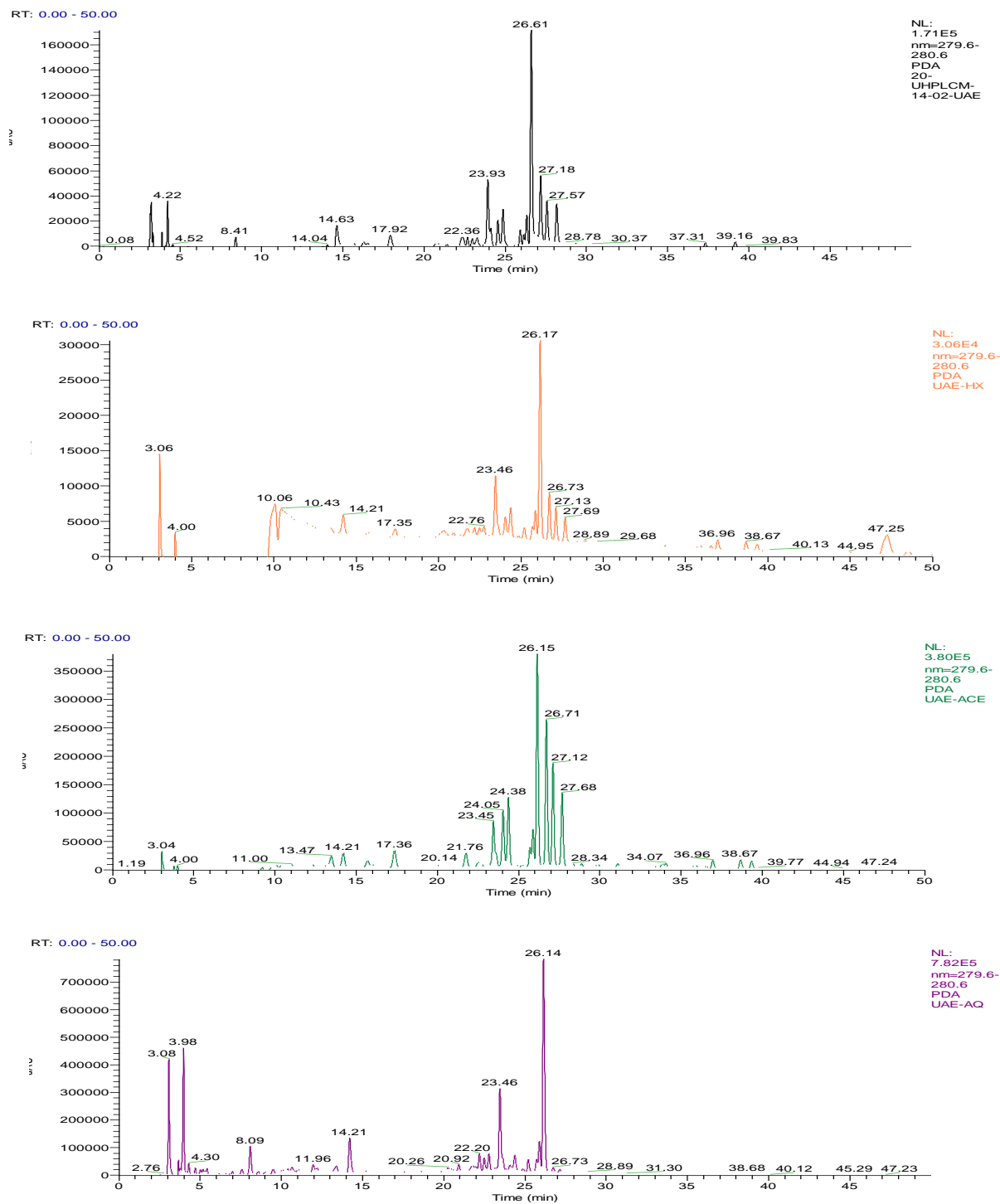
Toutes les fractions ont été analysées par HPLC-UV-MS/MS dans le but d'identifier la majorité des molécules phénoliques. Toutes les molécules détectées ont été caractérisées par étude de leur fragmentation obtenue par ESI-MS/MS en mode négatif, en comparant les données obtenues avec les extraits bruts et par l'injection de standards dans les mêmes conditions chromatographiques.

#### III.6.4.2. Empreintes chromatographiques des extraits et fraction

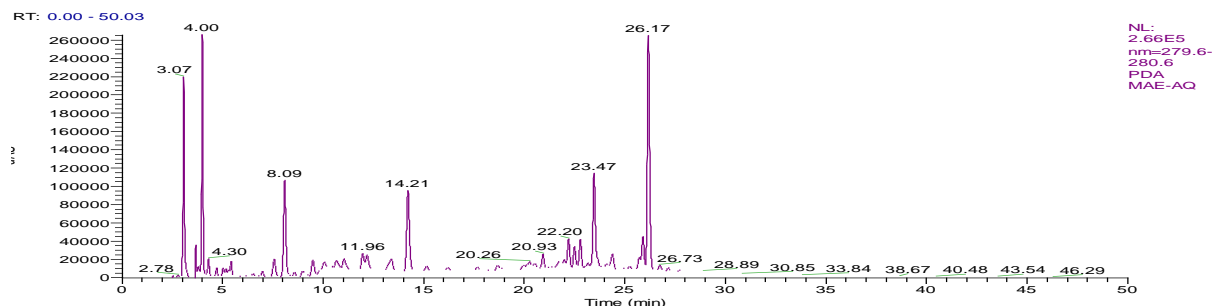
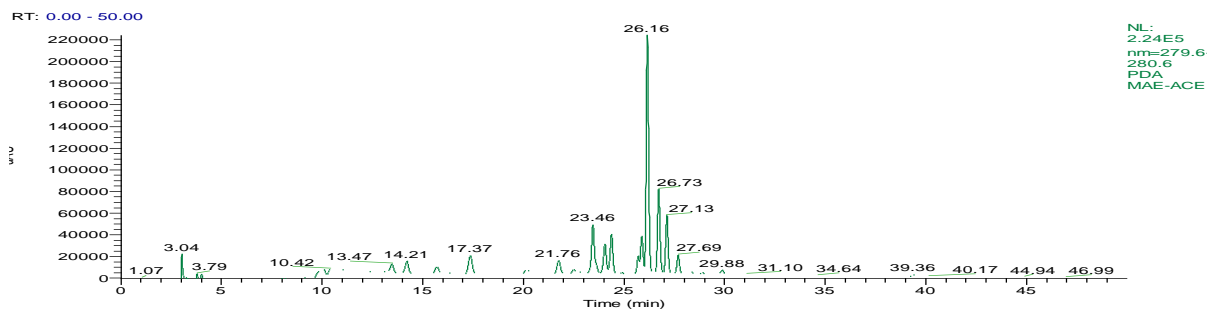
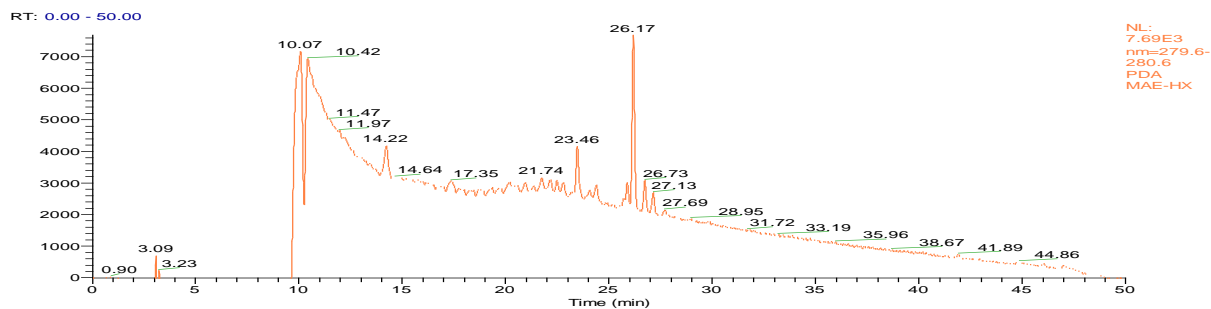
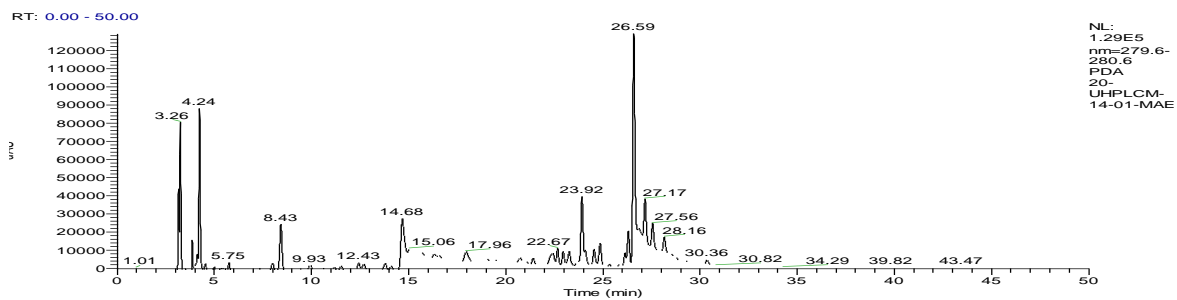
Les extraits bruts et ses fractions ont été analysés par HPLC-DAD à 279 (Figure III-25) et à 366 nm (Figure III-26). Les empreintes chromatographiques sont très semblables. Seule l'intensité relative des pics change ce qui est en accord avec le rendement de la méthode d'extraction utilisée. Pour les fractions F<sub>AE</sub> et F<sub>Aq</sub>, l'intensité des pics augmentent et avec l'apparaissent de nouveaux composés, ce qui est en accord avec l'augmentation de la TPC

observé ci-dessus. Bien que nous ayons identifié par HPLC MS/MS dans la partie III-4 les principaux composés de l'extrait UAHE, il peut être mentionné ici que les nouveaux composés qui sont détectés dans les fractions AE et Aq de l'extrait brut UAHE.

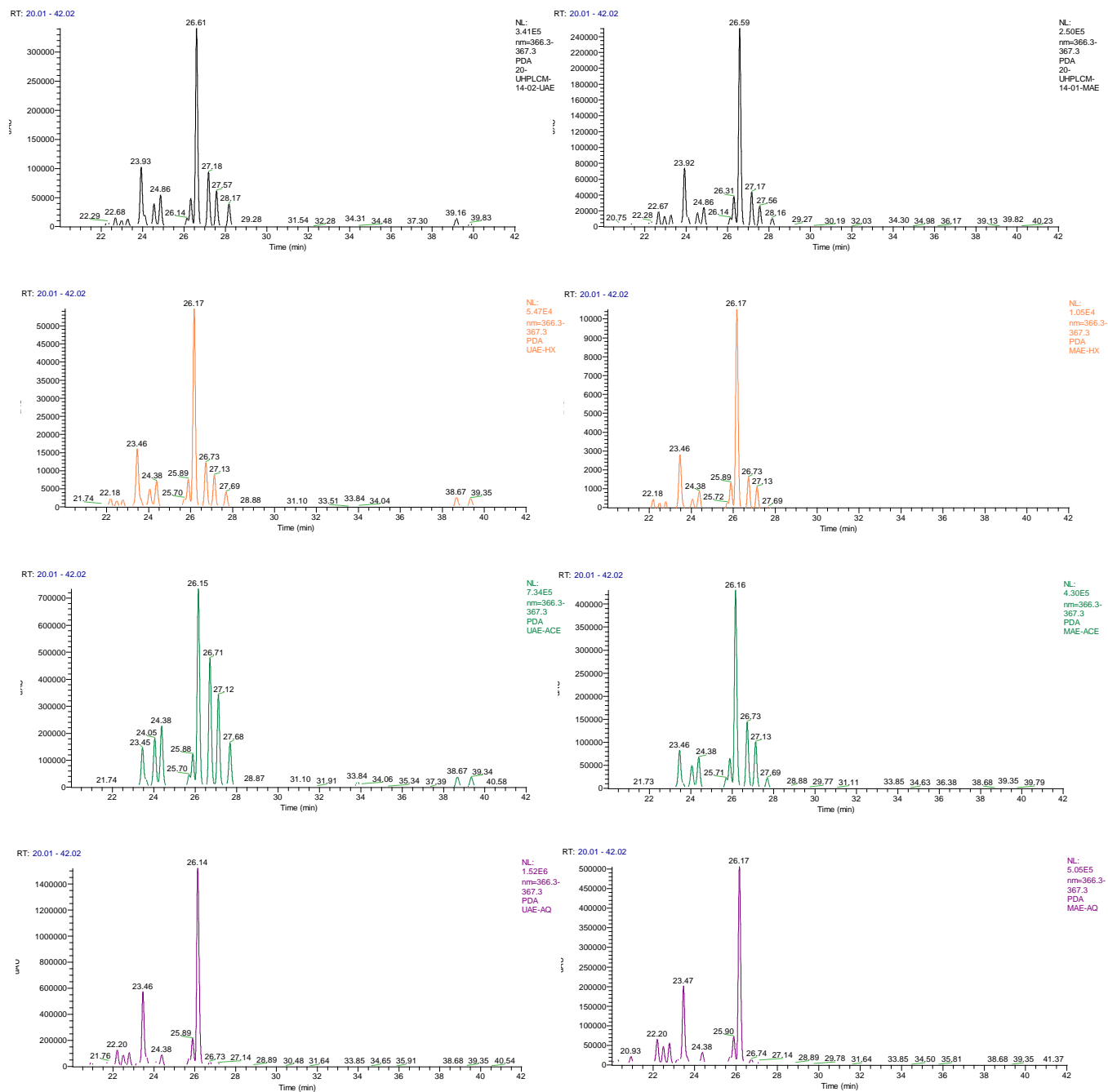
Bien que nous reviendrons de façon plus détaillée dans la partie III-3 sur l'identification par HPLC- MS/MS de ces nouveaux composés, il peut être mentionné ici que les molécules spécifiques qui sont détectées à 366 nm après une extraction hydroalcoolique assistée par ultrason (UAHE), sont la quercétine (tr = 33,80 et  $[M-H]^-$  m/z = 301), la kaempferol (tr = 38,67 et  $[M-H]^-$  m/z = 285) et l'isorhamnétine (tr = 39,34 et  $[M-H]^-$  m/z = 315). Ces flavonoïdes sont beaucoup moins polaires que ceux extraits dès l'application de l'extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE).



**Figure III-24 : Chromatogrammes d'extrait brut UAHE de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* obtenus par extraction hydroethanolique assistée par ultrason (85 mL/g, 80% d'éthanol et 32 min) et ses fractions d'hexane (orange), d'acétate d'éthyle (vert) et aqueux (violet). Colonne Acclaim Polar Advantage C18 (diamètre intérieur 4,6 ; longueur 250 mm ; 5  $\mu$ m) ; gradient constitué d'eau ultra-pure acidifié (à 2,5% par l'acide acétique) et de l'acétonitrile ; débit de 1 mL/min ; injection de 10  $\mu$ l ;  $\lambda = 279$  ; T = 25°C.**



**Figure III-25 : Chromatogrammes d'extract brut de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* obtenus par extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE) (45 mL/g, 500W et 3 cycles d'extraction) et ses fractions d'hexane (orange), d'acétate d'éthyle (vert) et aqueux (violet). Colonne Acclaim Polar Advantage C18 (diamètre intérieur 4,6 ; longueur 250 mm ; 5  $\mu$ m) ; gradient constitué d'eau ultra-pure acidifié (à 2,5% d'acide acétique) et de l'acétonitrile pure ; débit de 1 mL/min ; injection de 10  $\mu$ l ;  $\lambda$  = 279 ; T = 25°C.**



**Figure III-26 : Chromatogrammes des extraits bruts UAHE et MAAE de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* et ses fractions d'hexane (orange), d'acétate d'éthyle (vert) et aqueux (violet). Colonne Acclaim Polar Advantage C18 (diamètre intérieur 4,6 ; longueur 250 mm ; 5 µm) ; gradient constitué d'eau ultra-pure acidifiée (à 2,5% par l'acide acétique) et de l'acétonitrile pure ; débit de 1 mL/min ; injection de 10 µl ; λ = 366 nm ; T = 25°C.**



### III.6.5. Détermination de la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes

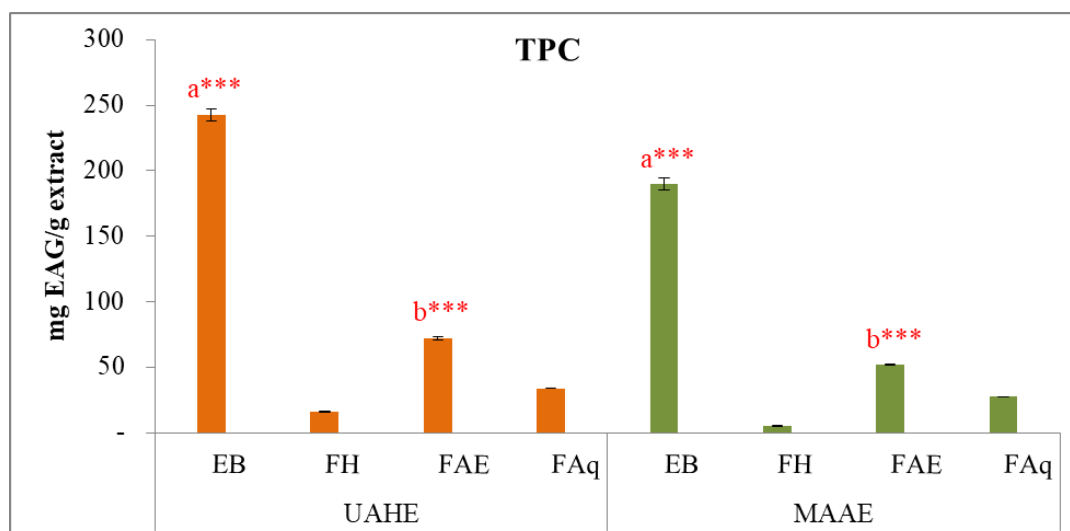
#### III.6.5.1. La teneur en composés phénoliques (TPC, Total Phenolic Content)

Les résultats ont été présentés dans le tableau III-15 et dans la figure III-24. Pour les extraits bruts, l'extrait UAHE (242,75 mg EAG/g d'extrait) possède significativement plus de composés phénoliques que l'extrait brut de MAAE (189,72 mg EAG/g d'extrait) ( $p < 0,0001$ ).

Concernant les fractions, la TPC varie de 4,81 à 72,01 mg EAG/g d'extrait. La TPC de  $F_{AE}$  de UAHE est significativement plus élevée que celle de  $F_{AE}$  de MAAE. De plus, la détermination de coefficient de corrélation de Pearson entre les résultats obtenus avec le test DPPH et la TPC ( $\rho = 0,920$  ;  $p < 0,01$ ) et entre le test FRAP et la TPC ( $\rho = 0,861$  ;  $p < 0,05$ ) indique que l'activité antioxydante peut être corrélée à la présence de composés phénoliques.

**Tableau III-15 : la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits bruts UAHE et MAAE et de ses fractions.**

Extraits	TPC	Flavonoïdes	
<b>UAHE</b>	<b>EB</b>	242,75	177,29
	<b>F<sub>H</sub></b>	15,69	47,06
	<b>F<sub>AE</sub></b>	72,01	432,72
	<b>F<sub>Aq</sub></b>	33,85	74,76
<b>MAAE</b>	<b>EB</b>	189,72	94,34
	<b>F<sub>H</sub></b>	4,81	3,20
	<b>F<sub>AE</sub></b>	51,55	189,39
	<b>F<sub>Aq</sub></b>	27,34	55,29

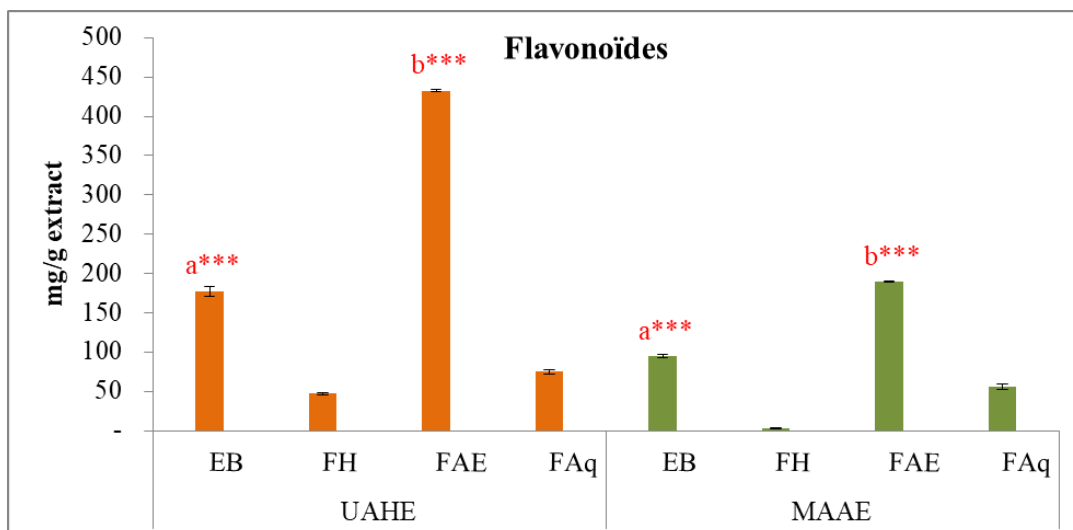


**Figure III-27 : le contenu total en composés phénoliques (TPC) des extraits bruts (UAHE et MAAE) et des fractions obtenues à 5000 µg/mL. a significativement différent des extraits bruts. b significativement différent de F<sub>AE</sub> de l'extrait brut correspondant. \*\*\* statistiquement significatif au niveau de confiance de 99.9%. EB : Extrait Brut, FH : Fraction hexane, FAE : Fraction acétate d'éthyle et FAq : Fraction aqueuse.**

### III.6.5.2. La teneur en flavonoïdes par HPLC

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes (Tableau III-15 et Figure III-25) révèlent que les extraits bruts répondent positivement, cependant l'extrait UAHE possède une teneur élevée en flavonoïdes et qui est par ailleurs, significativement différente de celle de l'extrait MAAE ( $p < 0.0001$ ). Les résultats de la fraction F<sub>AE</sub> de l'extrait brut UAHE est le plus riche en flavonoïdes 461,24g EQ/mg. La fraction F<sub>AE</sub> de l'extrait brut MAAE contient une bonne quantité mais relativement faible par rapport à celle de la fraction F<sub>AE</sub> de l'extrait brut UAHE, la teneur est de l'ordre de 189,39 mg/g. De plus, la détermination de coefficient de corrélation de Pearson entre les résultats obtenus avec le teste DPPH et la teneur en flavonoïdes ( $\rho = 0,984$  ;  $p < 0,01$ ) et entre le teste FRAP et la TPC ( $\rho = 0,850$  ;  $p < 0,05$ ) indique que l'activité antioxydante peut être corrélée à la présence des flavonoïdes.

Ce résultat suggère donc que les activités antimicrobiennes et antioxydantes obtenues pour les extraits bruts de fleurs et ses fractions F<sub>AE</sub> seraient dues à la présence de flavonoïdes.



**Figure III-28 : Quantification de la teneur en flavonoïdes par HPLC des extraits bruts (UAHE et MAAE) et des fractions obtenues à 5000 µg/mL. a significativement différent des extraits bruts. b significativement différent de FAE de l'extrait brut correspondant.**

\*\*\* et\* statistiquement significatif au niveau de confiance de 99.9% et de 95%. EB : Extrait Brut, FH : Fraction hexane, FAE : Fraction acétate d'éthyle et FAq : Fraction aqueuse.

### III.6.6. Corrélation entre les activités biologiques et l'étude photochimique

L'examen des résultats de bio-activités et du criblage phytochimique permet de mettre en évidence que les activités antimicrobienne et antioxydante sont liées à la présence de molécules phénoliques dans les différents extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*.

Les extraits bruts de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* ont été décrites comme antioxydantes et antimicrobien sur différents modèles in vitro en corrélation avec la présence des flavonoïdes et des dérivés d'acides phénoliques [24,29,30,36,135,140]. Dans notre étude, l'extrait aqueux obtenu par extraction assistée par microonde (MAAE) et l'extrait hydroalcolique obtenu par extraction assistée par ultrason (UAHE) ont montré que la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* est riche en composés bioactifs. La fraction la plus efficace vis-à-vis des micro-organismes étudiés semble être la même fraction qui possède la meilleure activité antioxydante pour UAHE et MAAE, ce qui nous permet de conclure que la concordance de ces deux propriétés biologiques est le résultat de la richesse extraire en composés phénoliques bioactifs.

L'analyse des fractions par HPLC-DAD a permis de mettre en évidence des molécules présentant un spectre d'absorption caractéristique de flavonols. De plus, l'analyse HPLC-MS a permis de confirmer la présence des flavonols glycosides surtout dans les fractions FAE de

MAAE et UAHE. Par conséquent, on peut penser que les activités antimicrobienne et antioxydante des fractions F<sub>AE</sub> sont dues à La présence de flavonoïdes.

Les résultats de notre étude confirment ceux trouvés dans de précédents travaux réalisés sur les extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* dans lesquels le potentiel antimicrobien et antioxydant ont été corrélés avec la présence des composés phénoliques.

## **Chapitre IV. Applications**

---

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les composés actifs de la plante. L'extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE) et l'extraction hydroalcoolique assistée par ultrasons (UAHE) sont celles qui permettent de préserver au mieux les molécules actives de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*.

Les extraits végétaux, en tant qu'ingrédient actif, sont utilisés/exploités dans les secteurs productifs de l'industries agro-alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et thérapeutiques pour la résolution de plusieurs problématiques liées à l'amélioration de la qualité de vie (santé et hygiène, compliment alimentaires, ...) et offrent de nombreux bienfaits pour la santé. Elles peuvent être une des voies possibles pour élargir le marché des ingrédients actifs à base des produits de terroir.

### **IV.1. Application de l'extrait de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica***

D'après des recherches réalisées sur la base de données des brevets Espacenet, les extraits végétaux, en tant que ingrédients actifs, pourraient bien être utilisée dans les formulations des produits alimentaires et cosmétiques pour améliorer la qualité thérapeutique et organoleptique.

#### **IV.1.1. Potentiel d'application de l'extrait MAAE en agroalimentaire**

La composition chimique de l'éco-extrait de MAAE (TPC, flavonoïdes et polysaccharides) conviendrait parfaitement pour améliorer la texture et la valeur nutritive d'une préparation alimentaire liquide telle que les sauces, les soupes et les boissons. Cet extrait pourrait être utilisé comme additif épaississant pour améliorer la viscosité et augmenter la stabilité des produits alimentaire. Il permettrait de donner une texture plus épaisse à la nourriture trop liquide. Par ailleurs, il peut améliorer le goût et la qualité et influencer les caractéristiques physiques et organoleptiques des aliments.

#### **IV.1.2. Potentiel d'application de l'extrait UAHE en cosmétiques**

En cosmétique, un antioxydant peut être utilisé pour deux raisons principales, l'un pour protéger la formule du produit de l'oxydation et l'autre pour leur propriété thérapeutique. L'extrait UAHE de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* est très riche en antioxydants naturels, il peut améliorer la qualité d'une formulation cosmétique.

Les antioxydants de l'extrait agissent pour la beauté de la peau. Ils l'aident à neutraliser les radicaux libres, pour lutter contre le stress oxydatif, celui-ci provoquant le vieillissement cutané prématuré. Par exemple, avant une exposition solaire, l'antioxydant est bien utile dans la composition de soin solaire, pour booster son efficacité et limiter les effets nocifs sur la peau causés par les rayons UV.

## **IV.2. Évaluation de la toxicité aiguë des extraits UAHE et MAAE de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica***

### **IV.2.1. Matériel et méthodes**

#### **IV.2.1.1. Animaux**

Les animaux utilisés dans les expérimentations réalisées au laboratoire Pharmacologie, Neurobiologie et Comportement de la Faculté des Sciences Semlalia. Ce sont des souris swiss mâles et femelles pesants entre 25 et 35 g.

Lors des expériences, les animaux étaient placés dans des cages transparentes (six souris/cage) dans une animalerie soumise à une photopériode de 12 h de lumière (7 à 19 h) et 12 h d'obscurité (19 à 7 h). La nourriture et l'eau est fournie à volonté.

#### **IV.2.1.2. Matériel végétal**

Dans cet essai de l'étude de la toxicité aiguë, nous nous sommes intéressés à étudier la toxicité aiguë de deux extraits : aqueuse (MAAE) et hydroalcoolique (UAHE) de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*. Les deux extraits sous forme de lyophilisats sont solubilisés dans l'eau distillée.

##### **IV.2.1.2.1. Principe**

L'essai consiste à administrer aux animaux en une seule prise de fortes doses de la substance testée et noter ensuite l'ensemble des signes toxiques qui surviennent après le traitement. En cas de doses létales, un pourcentage de mortalité et la DL 50 (dose provoquant 50 % de mortalité) sont calculés.

##### **IV.2.1.2.2. Méthodologie**

La toxicité aiguë des extraits a été testée sur des souris en leur administrant en une seule prise des doses croissantes des extraits.

Un groupe d'animaux ont été divisés au hasard en plusieurs lots (n=5). Le premier lot a servi de témoin normal. Six lots de cinq à six animaux ont reçu le lyophilisat de l'extrait

aqueux ou hydroalcoolique dissous dans de l'eau distillée respectivement à la dose de 1, 2 et 3 g/kg par voie orale (par gavage). Immédiatement après le traitement et durant les heures suivantes, les animaux sont observés pour noter toute anomalie ou changement du comportement normal.

De même, un suivi de 72 h est assuré pour chaque lot et durant lequel sont notés les paramètres suivants :

- Le comportement de l'animal et les signes de toxicité (piloérection, activité motrice, crampes, ...).

- Le poids corporel : les animaux sont pesés quotidiennement pour déterminer l'évolution du poids corporel.

- Le nombre de décès dans chaque lot en précisant le moment du décès pour déterminer le pourcentage de mortalité et calculer par la suite la DL 50.

#### **IV.2.1.2.3. Expérimentation :**

But : étudier la toxicité aigüe des extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*.

Les extraits ont été administrés en une seule prise par voie orale (par gavage) à raison de 10 mL/kg. Les animaux sont répartis selon le traitement comme suite :

##### **Groupe 1 :**

Lot 1 : Souris témoins

Lot 2 : Souris traitées par l'extrait aqueux (1 g/kg par gavage).

Lot 3 : Souris traitées par l'extrait hydroalcoolique (1 g/kg par gavage).

##### **Groupe 2 :**

Lot 1 : Souris témoins.

Lot 2 : Souris traitées par l'extrait aqueux (2 g/kg par gavage).

Lot 3 : Souris traitées par l'extrait hydroalcoolique (2 g/kg par gavage).

##### **Groupe 3 :**

Lot 1 : Souris témoins.

Lot 2 : Souris traitées par l'extrait aqueux (3 g/kg par gavage).

Lot 3 : Souris traitées par l'extrait hydroalcoolique (3 g/kg par gavage).

#### IV.2.2. Résultats et discussion

Les résultats obtenus de l'étude de toxicité aigüe montrent que l'administration orale de l'extrait aqueux et l'extrait hydroalcoolique de la fleur *Opuntia ficus-barbarica* à des doses de 1, 2 et 3 g/kg n'a provoqué aucun signe de toxicité chez les animaux traités. Leur comportement est resté normal et compatible à celui des témoins. Les souris restent immobiles pendant la première heure qui suit le traitement par les deux extraits. Ensuite, les animaux reprennent leur activité normale. Le poids des souris n'a pas subi de modification significative pendant les trois jours qui ont suivi les traitements de ces extraits (tableau IV-1).

L'administration orale de ces extraits à la dose maximale de 3 g par kg du poids de l'animal n'a provoqué aucun cas de mortalité. Les animaux reprennent leur activité normale à quelques heures après le traitement et ne subissent aucun changement dans l'évolution normale du poids corporel. Cependant, nous avons noté que ces animaux restent immobilisés pendant quelque temps (de 1h à 2 h suivant la dose) après traitement. Ceci indique qu'à forte dose, les extraits aqueux et hydroalcoolique provoqueraient une action sédatrice chez les animaux. Ce résultat confirmerait l'utilisation de cette fleur en médecine traditionnelle marocaine pour traiter un certain nombre de troubles en relation avec la santé humaine.

**Tableau IV-1 : Évolution du poids corporel chez des souris traitées par les extraits aqueux (lot 2) et hydroalcoolique (lot 3) de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* par voie orale à 3 g/kg.**

	Suivi du poids (g)			
	jour 0	jour 1	jour 2	jour 3
Lot1 (témoin)	30,9±0,35	31,2±0,38	31,1±0,45	31,5±0,17
Lot 2	29,8±1,10	29,4±1,17	30,5±0,75	30,4±0,96
Lot 3	30,3±0,35	30,2±0,38	30,7±0,45	31,1±0,17



## Conclusion

---

Les objectifs majeurs de ce travail de thèse étaient de valoriser les ressources naturelles et développer des méthodologies de procédés d'éco-extraction pour la récupération des antioxydants naturels à partir de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* disponibles au Maroc comme produit de terroir.

L'étude bibliographique a permis de montrer que la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* était une plante riche en molécules très diverses et qui présentait de nombreuses propriétés pharmacologiques. Des études phytochimiques ont mis en évidence que la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* contient des molécules couvrant une large gamme de polarité, telles que les glucides, les acides aminés, les lipides, les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes), les terpènes ainsi que les alcaloïdes. Outre sa richesse moléculaire, la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* est une plante qui est utilisée en médecine traditionnelle et qui est connue par ses propriétés pharmacologiques. Mis à part les autres parties de la plante qui sont de plus en plus étudiées, il apparaît clairement que les fleurs ont été très peu considérées.

De par la richesse de sa composition chimique, la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* apparaît comme une plante très intéressante pour développer des méthodologies d'extractions plus efficaces, plus rapides et plus « vertes ». Nous nous intéresserons également à mieux caractériser la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*, qui est très peu valorisée jusqu'à présent, dans l'optique de compléter les connaissances de cette plante très riche en bienfaits.

La première partie expérimentale est consacrée aux analyses physico-chimiques de la poudre de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*. Les résultats ont montré une teneur en eau de  $7,24\% \pm 0,04$ , un taux de cendres de  $7,11\% \pm 0,02$  et une activité d'eau de  $0,38 \pm 0,004$ . La fleur est riche en fibres alimentaires ( $16,37\% \pm 0,70$ ) et a un caractère acide ( $\text{pH} = 4,78 \pm 0,02$  et acidité titrable  $1,88 \text{ g d'acide citrique}/100 \text{ g}$ ). En outre, les fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* comportent une teneur considérable en sucres totaux et en protéine, leur fraction lipidique est modérée. Les paramètres  $L^*(74,00)$  et  $b^*(62,79)$  indiquant une luminosité dans la couleur jaune. Les propriétés fonctionnelles des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* se réfèrent à leur pouvoir de gonflement ( $8,2 \text{ g d'eau}/\text{g}$ ), leur capacité à retenir l'eau ( $8,4 \text{ g d'eau}/\text{g}$ ) et leur capacité à retenir de l'huile ( $1,8 \text{ g d'huile}/\text{g}$ ) dans la matrice végétale sèche, ces résultats montrent que la poudre des fleurs peut améliorer la viscosité de l'aliment ajouté et pourrait être utilisée comme épaississant naturel. En outre, les substances extractibles par l'eau ( $31,64$

g/100 g) sont beaucoup plus importantes que celles extractibles par l'éthanol (5,33 g/100 g). Ceci montre que la teneur en substances biologiquement actives dans les extraits de la fleur est très dépendante de la nature du solvant utilisé et de la solubilité des molécules.

Dans la seconde partie, nous sommes basés sur l'usage traditionnel de la fleur pour définir les protocoles et les conditions d'extractions conventionnelles (macération avec différents solvants, infusion à 40 ° C ou 80 ° C et décoction à 100 ° C). Ce travail a présenté l'impact sur le rendement de l'extraction, les constituants phytochimiques et l'activité antioxydante pour recenser la technique d'extraction la plus performante. L'étude quantitative a montré que la composition en polyphénols, flavonoïdes et polysaccharides varie significativement en fonction de la méthode d'extraction. Les composés phénoliques présentent une teneur plus élevée en extrait hydroalcoolique, alors que les extraits aqueux sont plus riches en polysaccharides. L'extraction à des températures élevées et à longue durée augmente la teneur en polysaccharides mais pourrait conduire à la dégradation des constituants phénoliques. L'activité antioxydante des extraits de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* a montré que les extraits hydroalcooliques présentent les activités les plus élevées. Les extraits aqueux obtenus à des températures élevées et de courtes durées montrent des activités antioxydantes importantes, ce qui suggère qu'ils sont les meilleures méthodes traditionnelles efficaces pour l'extraction des antioxydants des fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica*. En effet, les extraits naturels de fleurs d'*Opuntia ficus-barbarica* contiennent une grande variété de composés chimiques auxquels sont attribués des capacités antioxydantes. Aussi, la qualité thérapeutique de cette fleur est principalement liée à l'efficacité et à la sélectivité de la méthode d'extraction.

La troisième partie a consisté à mettre en œuvre deux méthodologies innovantes de l'éco-extraction. Nous avons pour cela développé une extraction assistée par ultrasons pour extrait hydroalcoolique et une extraction assistée par microonde pour extrait aqueuse « éco-extrait ».

L'extraction hydroalcoolique assistée par ultrason (UAHE) est une méthode prometteuse pour préparer un extrait antioxydant à partir de la fleur d '*Opuntia ficus-barbarica*. L'originalité de la méthode est basée sur l'utilisation des ondes ultrasons avec une combinaison entre le mélange solvant/matériel végétal, la concentration de l'éthanol dans l'eau et le temps d'extraction. Les ondes ultrasons améliorent à la fois la pénétration du solvant dans le matériel végétal et la libération intracellulaire du produit en perturbant les parois cellulaires. C'est une technique efficace et rapide qui s'inscrit dans les démarches de

l'éco-extraction du végétal par l'utilisation de solvant alternatif et la réduction de la consommation énergétique. Les conditions d'extraction UAHE optimisées étaient un rapport liquide/solide de 85 mL/g, 80% de concentration d'éthanol dans l'eau et un temps d'extraction de 32 min. Ceux-ci ont fourni un TPC de  $244,91 \pm 9,31$  mg EAG/g d'extrait, TFC de  $92,51 \pm 3,85$  mg ER/g d'extrait, DPPH de  $224,71 \pm 7,78$   $\mu$ mol ET/g d'extrait et FRAP de  $426,79 \pm 6,65$   $\mu$ mol ET/g d'extrait. De plus, l'analyse ESI-DAD-MS de l'extrait optimisée a permis l'identification de 16 composés avec un taux plus élevé de flavonoïdes, en particulier l'isorhamnétine-3-O-rutinoside ( $68,72 \pm 1,16$  mg/g) suivis de la quercétine-3-O-rutinoside ( $25,87 \pm 0,23$  mg/g) et l'isorhamnétine-3-O-glucoside ( $21,76 \pm 1,64$  mg/g).

Aussi, il a été démontré que l'extraction aqueuse assistée par microonde (MAAE) constituait une méthode appropriée pour l'éco-extraction des composés phénoliques de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*. L'originalité de la méthode est basée sur l'utilisation combinée de rapport eau/matrice végétale et de chauffage rapide par microonde avec des périodes de refroidissement. L'extraction est réalisée sans solvant organique toxique pour la santé et l'environnement et avec une quantité d'eau optimale pour la matrice végétale, ce processus s'inscrit dans la démarche de l'éco-extrait. Les meilleures conditions d'extraction MAAE étaient un rapport liquide/solide de 85mL/g, une puissance de 500 W et trois cycles d'extraction. Ceux-ci ont fourni un rendement de 20,52%, une teneur totale en polyphénols de  $189,72 \pm 0,79$  mg EAG/g d'extrait et une teneur en flavonoïdes de  $96,72 \pm 3,09$  mg/g d'extrait. Ces résultats montrent que la méthode MAAE a une efficacité plus élevée pour l'extraction des composés phénoliques que les autres méthodes d'extractions conventionnelles aqueuses.

En dernière partie, le fractionnement des extraits bruts obtenus par les méthodes UAHE et MAAE de la fleur d'*Opuntia ficus barbarica* a permis de réaliser une étude phytochimique, l'identification structurale et les tests d'activité biologique (antioxydant et antimicrobien). L'activité antioxydante des extraits bruts, comme l'activité antimicrobienne, se retrouvent après fractionnement dans la fraction d'acétate d'éthyle, ce qui explique que les activités mises en évidence dans les différents extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* seraient dues à la présence de composés phytochimiques tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes présentés dans nos résultats précédents. L'extrait le plus efficace vis-à-vis des micro-organismes étudiés semble être le même extrait qui possède la meilleure activité antioxydante pour la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*, ce qui nous permet de conclure que la concordance de ces deux propriétés biologiques est le résultat de la richesse extraire en

composés bioactifs. Par ailleurs, les deux extraits bruts UAHE et MAAE de départ présentent une activité moindre par rapport aux extraits fractionnés, suggérant un effet de concentration des molécules actives présentes dans l'extrait brut.

L'étude de la toxicité aiguë des extraits UAHE et MAAE de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* a montré que l'administration des doses de 1, 2 et 3 g/kg par voie orale n'a provoqué aucune létalité et aucun changement du comportement général des souris. La DL 50 est, par conséquent, supérieur à 3000 mg/kg par voie orale. Cette étude suggère que les extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica* pourraient être explorés en tant que ingrédients actifs et à utiliser, par exemple, dans des boissons bénéfiques pour la santé.

En conclusion, nos travaux présentent des avantages majeurs dans des techniques d'extraction de produits naturels UAHE et MAAE qui sont à la fois efficace, rapide et qui s'inscrivent dans les démarches de « l'éco-extraction » par l'utilisation des solvants alternatifs, diminuer le temps de l'extraction (moins de consommation d'énergie), améliorer la qualité de rendement et la rentabilité de la matière première.

Parmi les perspectives envisagées, l'une concerne l'étude pharmacologique sur les extraits de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*. Par ailleurs, il serait donc intéressant d'intégrer ces extraits, en tant qu'ingrédients verts et actifs, dans les formulations thérapeutiques pour créer des nouveaux produits bénéfiques pour la santé.

Une autre perspective envisagée est d'intégrer d'autres critères, comme les impacts environnementaux, pour améliorer les méthodologies d'optimisation de l'éco-extraction.

Nous espérons par ce travail avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation des produits de terroir Marocain et une importante contribution phytochimique de la fleur d'*Opuntia ficus-barbarica*.

## Références bibliographiques

---

1. Chemat, F.; Vian, M.A.; Cravotto, G. Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 8615–8627, doi:10.3390/ijms13078615.
2. Liu, X.; Luo, G.; Wang, L.; Yuan, W. Optimization of antioxidant extraction from edible brown algae *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Food Bioprod. Process.* **2019**, *114*, 205–215, doi:10.1016/j.fbp.2019.01.003.
3. Aichi-Yousfi, H.; Meddeb, E.; Rouissi, W.; Hamrouni, L.; Rouz, S.; Rejeb, M.N.; Ghrabi-Gammar, Z. Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous and ethanolic leaf extracts of six Tunisian species of genus *Capparis* – *Capparaceae*. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *92*, 218–226, doi:10.1016/j.indcrop.2016.07.051.
4. Wong-paz, J.E.; Muñoz-márquez, D.B.; Aguilar-zárate, P.; Cruz, K.; Reyes-luna, C.; Rodríguez, R.; Aguilar, C.N. *Extraction of bioactive phenolic compounds by alternative technologies*; Elsevier Inc., 2017; ISBN 9780128115213.
5. Costa, R.G.; Treviño, I.H.; de Medeiros, G.R.; Medeiros, A.N.; Pinto, T.F.; de Oliveira, R.L. Effects of replacing corn with cactus pear (*Opuntia ficus indica* Mill) on the performance of Santa Inês lambs. *Small Rumin. Res.* **2012**, *102*, 13–17, doi:10.1016/j.smallrumres.2011.09.012.
6. Poupon, J. L'aménagement et l'amélioration des parcours forestiers au Maroc - 2ème Partie. In *Forêt Méditerranéenne*; 1980; Vol. 1, pp. 53–60.
7. Casas, A.; Barbera, G. *Cacti biology and uses*; University of California Press: Berkeley, Los Angeles, London, 2002; ISBN 0520231570.
8. Arba, M. Le cactus *Opuntia*, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc. *Symp. Int. «Agriculture durable en région Méditerranéenne (AGDUMED)»*, Rabat, Maroc **2009**, 215–223.
9. Fennane, M.; Ibn Tattou, M.; Mathez, J.; Ouyahya, A.; EL Oualidi, J. *Flore pratique du Maroc. Manuel de détermination des plantes vasculaires.*; 1999; Vol. 1;.
10. BEITLAKHDAR, J. CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA PHARMACOPÉE TRADITIONNELLE AU MAROC : LA SITUATION ACTUELLE, LES PRODUITS, LES SOURCES DU SAVOIR. Enquête ethnopharmacologique de terrain réalisée de 1969 à 1992, UNIVERSITÉ DE MEIZ, 1997.
11. El Kharrassi, Y.; Mazri, M.A.; Benyahia, H.; Benaouda, H.; Nasser, B.; El Mzouri, E.H. Fruit and juice characteristics of 30 accessions of two cactus pear species (*Opuntia ficus indica* and *Opuntia megacantha*) from different regions of Morocco. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *65*, 610–617, doi:10.1016/J.LWT.2015.08.044.
12. Leuenberger, B.E. Interpretation and Typification of *Cactus ficus-indica* L. and *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller (Cactaceae). *Taxon* **1991**, *40*, 621, doi:10.2307/1222775.
13. Aruwa, C.E.; Amoo, S.O.; Kudanga, T. *Opuntia* (Cactaceae) plant compounds,

- biological activities and prospects – A comprehensive review. *Food Res. Int.* **2018**, *112*, 328–344, doi:10.1016/j.foodres.2018.06.047.
14. Han, H.; Felker, P. Field validation of water-use efficiency of the CAM plant *Opuntia ellisiana* in south Texas. *J. Arid Environ.* **1997**, *36*, 133–148, doi:10.1006/jare.1996.0202.
  15. Inglese, P.; Mondragon, C.; Nefzaoui, A.; Sáenz, C. *ECOLOGIE, DU FIGUIER UTILISATIONS CULTURE ET DE BARBARIE*; 2018; ISBN 9789251303443.
  16. Ait Hamou, A. An overview on medicinal and cosmetic uses of cactus in Morocco. *Cactusnet Newsl.* **2007**, *11*, 51–56.
  17. Lee, Y.-C.; Pyo, Y.-H.; Ahn, C.-K.; Kim, S.-H. Food Functionality of *Opuntia ficus-indica* var. Cultivated in Jeju Island. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2005**, *10*, 103–110, doi:10.3746/jfn.2005.10.1.103.
  18. Abdel-Hameed, E.-S.S.; Nagaty, M.A.; Salman, M.S.; Bazaid, S.A. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chem.* **2014**, *160*, 31–38, doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.060.
  19. Kharrassi, Y. El Mise en évidence de la diversité des populations de cactus ( *Opuntia spp.* ) au Maroc et de la modulation du métabolisme lipidique par des extraits naturels et de phytostérols issues de cactus ou d’huile d’Argan dans les cellules microgliale. **2015**, 221.
  20. Jonas, A.; Krapf, D. Cactus flower extracts may prove beneficial in benign prostatic hyperplasia due to inhibition of 5 $\alpha$  reductase activity , aromatase activity and lipid peroxidation. **1998**, *26*, 265–270.
  21. Benayad, Z.; Martinez-Villaluenga, C.; Frias, J.; Gomez-Cordoves, C.; Es-Safi, N.E. Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Moroccan *Opuntia ficus-indica* flowers obtained by different extraction methods. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *62*, 412–420, doi:10.1016/j.indcrop.2014.08.046.
  22. Yeddes, N.; Chérif, J.K.; Guyot, S.; Baron, A.; Trabelsi-Ayadi, M. Phenolic profile of Tunisian *Opuntia Ficus indica* thornless form flowers via chromatographic and spectral analysis by reversed phase-high performance liquid chromatography-UV-photodiode array and electrospray ionization-mass spectrometer. *Int. J. Food Prop.* **2014**, *17*, 741–751, doi:10.1080/10942912.2012.665404.
  23. Ammar, I.; Ennouri, M.; Khemakhem, B.; Yangui, T.; Attia, H. Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *37*, 34–40, doi:10.1016/j.indcrop.2011.11.027.
  24. Ammar, I.; Bardaa, S.; Mzid, M.; Sahnoun, Z.; Rebaii, T.; Attia, H.; Ennouri, M. Antioxidant, antibacterial and in vivo dermal wound healing effects of *Opuntia* flower extracts. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *81*, 483–490, doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.08.039.
  25. Galati, E.; Tripodo, M.; Trovato, A.; Miceli, N.; Monforte, M.. Biological effect of

- Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *79*, 17–21, doi:10.1016/S0378-8741(01)00337-3.
26. Ammar, I.; Ben Salem, M.; Harrabi, B.; Mzid, M.; Bardaa, S.; Sahnoun, Z.; Attia, H.; Ennouri, M. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) flowers. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *112*, 313–319, doi:10.1016/j.indcrop.2017.12.028.
  27. Alimi, H.; Hfaiedh, N.; Bouoni, Z.; Sakly, M.; Ben Rhouma, K. Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* flowers extract in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *32*, 406–416, doi:10.1016/j.etap.2011.08.007.
  28. De Leo, M.; Abreu, M.B. De; Pawlowska, A.M.; Cioni, P.L.; Braca, A. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC-PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. *Phytochem. Lett.* **2010**, *3*, 48–52, doi:10.1016/j.phytol.2009.11.004.
  29. Ammar, I.; Ennouri, M.; Attia, H. Phenolic content and antioxidant activity of cactus (*Opuntia ficus-indica* L.) flowers are modified according to the extraction method. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *64*, 97–104, doi:10.1016/j.indcrop.2014.11.030.
  30. Chahdoura, H.; Barreira, J.C.M.; Barros, L.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C.F.R.; Achour, L. Phytochemical characterization and antioxidant activity of *Opuntia microdasys* (Lehm.) Pfeiff flowers in different stages of maturity. *J. Funct. Foods* **2014**, doi:10.1016/j.jff.2014.04.011.
  31. Saidi, N.; Elmsellem, H.; Ramdani, M.; Yousfi, F.; Rmili, R.; Azzaoui, K.; Aouniti, A.; Chahboun, N. A Moroccan *Opuntia Ficus Indica* methanolic flowers extract as an eco-friendly antioxidant and anti-corrosion for mild steel in 1 M HCl. *J. Mater. Environ. Sci.* **2016**, *7*, 4105–4115.
  32. Ammar, I.; Ennouri, M.; Bouaziz, M.; Ben Amira, A.; Attia, H. Phenolic Profiles, Phytochemicals and Mineral Content of Decoction and Infusion of *Opuntia ficus-indica* Flowers. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2015**, *70*, 388–394, doi:10.1007/s11130-015-0505-6.
  33. Chahdoura, H.; Barreira, J.C.M.; Barros, L.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C.F.R.; Achour, L. Phytochemical characterization and antioxidant activity of *Opuntia microdasys* (Lehm.) Pfeiff flowers in different stages of maturity. *J. Funct. Foods* **2014**, *9*, 27–37, doi:10.1016/j.jff.2014.04.011.
  34. Cevallos-Casals, B.A.; Byrne, D.; Okie, W.R.; Cisneros-Zevallos, L. Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties. *Food Chem.* **2006**, *96*, 273–280, doi:10.1016/j.foodchem.2005.02.032.
  35. Lewis, N.G.; Davin, L.B.; Sarkanen, S. Lignin and Lignan Biosynthesis: Distinctions and Reconciliations. In *Chemical & Engineering News*; 1998; Vol. 78, pp. 1–27.
  36. Ouerghemmi, I.; Harbeoui, H.; Aidi Wannes, W.; Bettaieb Rebey, I.; Hammami, M.; Marzouk, B.; Saidani Tounsi, M. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tunisian cactus pear (*Opuntia ficus indica* L.) flower. *J. Food Biochem.* **2017**, *41*, e12390, doi:10.1111/jfbc.12390.

37. Stoclet, J.-C.; Schini-Kerth, V. Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. *Ann. Pharm. Françaises* **2011**, *69*, 78–90, doi:10.1016/j.pharma.2010.11.004.
38. MARKHAM, K.R. Flavones, Flavonols and their Glycosides. In *METHODS IN PLANT BIOCHEMISTRY: Volume 1: Plant Phenolics*; ACADEMIC PRESS LIMITED, 1989; Vol. 1, pp. 197–235 ISBN 0124610110.
39. Dacosta, Y. *Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques*; 2003; ISBN 2-9518220-0-6 - 9782951822009.
40. Wollenweber, E. Flavones and Flavonols. In *The Flavonoids*; Springer US: Boston, MA, 1982; pp. 189–259 ISBN 978-1-4899-2915-0.
41. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 1–16, doi:10.1155/2013/162750.
42. Karabin, M.; Hudcova, T.; Jelinek, L.; Dostalek, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1063–1090, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.009.
43. Havsteen, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 1141–1148, doi:10.1016/0006-2952(83)90262-9.
44. Biesaga, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2505–2512, doi:10.1016/j.chroma.2011.02.059.
45. Melin, D. Role de la phenylalanine dans la biosynthese des flavonoides et acides “cinnamique” dans les tiges volubiles de *Periploca Graeca*. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2193–2197, doi:10.1016/S0031-9422(00)91097-5.
46. Rendeiro, C.; Rhodes, J.S.; Spencer, J.P.E. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochem. Int.* **2015**, *89*, 126–139, doi:10.1016/j.neuint.2015.08.002.
47. Lahouel, M.; Boulkour, S.; Segueni, N.; Fillastre, J.. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathol. Biol.* **2004**, *52*, 314–322, doi:10.1016/j.patbio.2004.01.001.
48. Miliauskas, G.; Venskutonis, P.R.; Van Beek, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* **2004**, *85*, 231–237, doi:10.1016/j.foodchem.2003.05.007.
49. Ahmadian-Kouchaksaraie, Z.; Niazmand, R.; Najafi, M.N. Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2016**, *36*, 234–244, doi:10.1016/j.ifset.2016.07.005.
50. Ahmadinejad, F.; Geir Møller, S.; Hashemzadeh-Chaleshtori, M.; Bidkhorji, G.; Jami, M.-S. Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants* **2017**, *6*, 51, doi:10.3390/antiox6030051.



51. Losada-Barreiro, S.; Bravo-Díaz, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *133*, 379–402, doi:10.1016/j.ejmech.2017.03.061.
52. Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Bitto, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–13, doi:10.1155/2017/8416763.
53. Kirschweng, B.; Tátraaljai, D.; Földes, E.; Pukánszky, B. Natural antioxidants as stabilizers for polymers. *Polym. Degrad. Stab.* **2017**, *145*, 25–40, doi:10.1016/j.polymdegradstab.2017.07.012.
54. Cadet, J.; Davies, K.J.A.; Medeiros, M.H.; Di Mascio, P.; Wagner, J.R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *107*, 13–34, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049.
55. Cadet, J.; Loft, S.; Olinski, R.; Evans, M.D.; Bialkowski, K.; Richard Wagner, J.; Dedon, P.C.; Møller, P.; Greenberg, M.M.; Cooke, M.S. Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. *Free Radic. Res.* **2012**, *46*, 367–381, doi:10.3109/10715762.2012.659248.
56. Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1147–1150, doi:10.1042/BST0351147.
57. WILLCOX, J.K.; ASH, S.L.; CATIGNANI, G.L. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 275–295, doi:10.1080/10408690490468489.
58. Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M.; Aggarwal, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1603–1616, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
59. Nilsson, R.; Liu, N.-A. Nuclear DNA damages generated by reactive oxygen molecules (ROS) under oxidative stress and their relevance to human cancers, including ionizing radiation-induced neoplasia part I: Physical, chemical and molecular biology aspects. *Radiat. Med. Prot.* **2020**, *1*, 140–152, doi:10.1016/j.radmp.2020.09.002.
60. Hayes, J.D.; Dinkova-Kostova, A.T.; Tew, K.D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 167–197, doi:10.1016/j.ccell.2020.06.001.
61. Cheng, Y.T.; Yang, C.C.; Shyur, L.F. Phytomedicine—Modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. *Pharmacol. Res.* **2016**, *114*, 128–143, doi:10.1016/j.phrs.2016.10.022.
62. Ramos, C. de O.; Campos, K.K.D.; Costa, G. de P.; Cangussú, S.D.; Talvani, A.; Bezerra, F.S. Taurine treatment decreases inflammation and oxidative stress in lungs of adult mice exposed to cigarette smoke. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *98*, 50–57, doi:10.1016/j.yrtph.2018.07.008.
63. Delgado-Roche, L.; Mesta, F. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. *Arch. Med. Res.* **2020**, *51*,

384–387, doi:10.1016/j.arcmed.2020.04.019.

64. Dua, K.; Malyla, V.; Singhvi, G.; Wadhwa, R.; Krishna, R.V.; Shukla, S.D.; Shastri, M.D.; Chellappan, D.K.; Maurya, P.K.; Satija, S.; et al. Increasing complexity and interactions of oxidative stress in chronic respiratory diseases: An emerging need for novel drug delivery systems. *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *299*, 168–178, doi:10.1016/j.cbi.2018.12.009.
65. Dickerhof, N.; Huang, J.; Min, E.; Michaëlsson, E.; Lindstedt, E.-L.; Pearson, J.F.; Kettle, A.J.; Day, B.J. Myeloperoxidase inhibition decreases morbidity and oxidative stress in mice with cystic fibrosis-like lung inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *152*, 91–99, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.001.
66. Ravarotto, V.; Simioni, F.; Pagnin, E.; Davis, P.A.; Calò, L.A. Oxidative stress – chronic kidney disease – cardiovascular disease: A vicious circle. *Life Sci.* **2018**, *210*, 125–131, doi:10.1016/j.lfs.2018.08.067.
67. Wang, L.; Chen, Q.; Zhuang, S.; Wen, Y.; Cheng, W.; Zeng, Z.; Jiang, T.; Tang, C. Effect of *Anoectochilus roxburghii* flavonoids extract on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Induced oxidative stress in LO<sub>2</sub> cells and D-gal induced aging mice model. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *254*, 112670, doi:10.1016/j.jep.2020.112670.
68. Yener, I.; Kocakaya, S.O.; Ertas, A.; Erhan, B.; Kaplaner, E.; Oral, E.V.; Yilmaz-Ozden, T.; Yilmaz, M.A.; Ozturk, M.; Kolak, U. Selective in vitro and in silico enzymes inhibitory activities of phenolic acids and flavonoids of food plants: Relations with oxidative stress. *Food Chem.* **2020**, *327*, 127045, doi:10.1016/j.foodchem.2020.127045.
69. Zhao, L.; Yuan, B.-D.; Zhao, J.-L.; Jiang, N.; Zhang, A.-Z.; Wang, G.-Q.; Li, M.-Y. Amelioration of hexavalent chromium-induced bioaccumulation, oxidative stress, tight junction proteins and immune-related signaling factors by *Allium mongolicum* Regel flavonoids in *Ctenopharyngodon idella*. *Fish Shellfish Immunol.* **2020**, *106*, 993–1003, doi:10.1016/j.fsi.2020.09.005.
70. Li, S.; Zhang, Q.; Ding, Y.; Wang, X.; Liu, P. Flavonoids ameliorate aluminum chloride-induced learning and memory impairments via suppression of apoptosis and oxidative stress in rats. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *212*, 111252, doi:10.1016/j.jinorgbio.2020.111252.
71. Wang, L.; Weller, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 300–312, doi:10.1016/j.tifs.2005.12.004.
72. Tiwari, B.K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2015**, *71*, 100–109, doi:10.1016/j.trac.2015.04.013.
73. Vinatoru, M.; Mason, T.J.; Calinescu, I. Ultrasonically Assisted Extraction (UAE) and Microwave Assisted Extraction (MAE) of Functional Compounds from Plant Materials. *Trends Anal. Chem.* **2017**, doi:10.1016/j.trac.2017.09.002.
74. Chemat, P.F. Eco-Extraction des produits naturels : procédés durables et solvants verts. **2010**, *6*.

75. Xu, D.P.; Zheng, J.; Zhou, Y.; Li, Y.; Li, S.; Li, H. Bin Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chem.* **2017**, *217*, 552–559, doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.013.
76. PÉTRIER, C.; GONDREXON, N.; BOLDO, P. Ultrasons et sonochimie. *Tech. l'ingénieur Intensif. des procédés méthodes d'analyse durable* **2008**.
77. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *34*, 540–560, doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.
78. Rutkowska, M.; Namieśnik, J.; Konieczka, P. Ultrasound-Assisted Extraction. *Appl. Green Solvents Sep. Process.* **2017**, 301–324, doi:10.1016/B978-0-12-805297-6.00010-3.
79. Dahmoune, F.; Spigno, G.; Moussi, K.; Remini, H.; Cherbal, A.; Madani, K. Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind. Crops Prod.* **2014**, doi:10.1016/j.indcrop.2014.06.035.
80. Panja, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Curr. Opin. Food Sci.* 2018.
81. Baghdikian, B.; Filly, A.; Fabiano-Tixier, A.S.; Petitcolas, E.; Mabrouki, F.; Chemat, F.; Ollivier, É. Extraction by solvent using microwave and ultrasound-assisted techniques followed by HPLC analysis of Harpagoside from *Harpagophytum procumbens* and comparison with conventional solvent extraction methods. *Comptes Rendus Chim.* **2016**, *19*, 692–698, doi:10.1016/j.crci.2016.02.020.
82. Ameer, K.; Shahbaz, H.M.; Kwon, J.H. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2017.
83. Mandal, V.; Mohan, Y.; Hemalatha, S. Microwave Assisted Extraction - An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal PHCOG REV.: Review Article Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacogn. Rev.* **2007**.
84. Delazar, A.; Nahar, L.; Hamedeyazdan, S.; Sarker, S.D. Microwave-Assisted Extraction in Natural Products Isolation. In *Natural Products Isolation*; 2012; Vol. 864, pp. 89–115 ISBN 978-1-61779-623-4.
85. Karami, Z.; Emam-Djomeh, Z.; Mirzaee, H.A.; Khomeiri, M.; Mahoonak, A.S.; Aydani, E. Optimization of microwave assisted extraction (MAE) and soxhlet extraction of phenolic compound from licorice root. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *52*, 3242–3253, doi:10.1007/s13197-014-1384-9.
86. Krishnan, R.Y.; Rajan, K.S. Influence of microwave irradiation on kinetics and thermodynamics of extraction of flavonoids from *Phyllanthus emblica*. *Brazilian J. Chem. Eng.* **2017**, *34*, 885–899, doi:10.1590/0104-6632.20170343s20150628.

87. Dong, H.; Lin, S.; Zhang, Q.; Chen, H.; Lan, W.; Li, H.; He, J.; Qin, W. Effect of extraction methods on the properties and antioxidant activities of Chuanminshen violaceum polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 179–185, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.08.074.
88. Sutivisedsak, N.; Cheng, H.N.; Willett, J.L.; Lesch, W.C.; Tangsrud, R.R.; Biswas, A. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 516–519, doi:10.1016/j.foodres.2009.09.014.
89. Ramawat, K.G.; Mérillon, J.M. *Natural Products*; Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; ISBN 978-3-642-22143-9.
90. Michel, T.; Destandau, E.; Elfakir, C. Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1380–1386, doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.112.
91. Mustafa, A.; Turner, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *703*, 8–18, doi:10.1016/j.aca.2011.07.018.
92. Tzia, C.; Liadakis, G. *Extraction Optimization in Food Engineering*; Edition, 1st, Ed.; CRC Press, 2003; ISBN 9780429164576.
93. Naviglio; Scarano; Ciaravolo; Gallo Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques. *Foods* **2019**, *8*, 245, doi:10.3390/foods8070245.
94. Galanakis, C.M.; Castro-Muñoz, R.; Cassano, A.; Conidi, C. Recovery of high-added-value compounds from food waste by membrane technology. In *Membrane Technologies for Biorefining*; Elsevier, 2016; pp. 189–215 ISBN 9780081004524.
95. Watson, R.R. *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*; Elsevier, 2019; ISBN 9780128137680.
96. Oreopoulou, V. Food and Bioproducts Processing Hydro-alcoholic extraction kinetics of phenolics from oregano : Optimization of the extraction. *Food Bioprod. Process.* **2020**, *123*, 378–389, doi:10.1016/j.fbp.2020.07.017.
97. Medina-Torres, N.; Ayora-Talavera, T.; Espinosa-Andrews, H.; Sánchez-Contreras, A.; Pacheco, N. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy* **2017**, *7*, doi:10.3390/agronomy7030047.
98. Spigno, G.; Tramelli, L.; De Faveri, D.M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* **2007**, *81*, 200–208, doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021.
99. Shahzad Aslam, M.; Syarhabil Ahmad, M.; Stefanova Atanassova, M.; Ayaz Ahmad, M. Mechanochemical-assisted extraction method on Medicinal plants: A Brief Review. *Adv. Environ. Biol.* **2017**, *11*, 84–90.
100. Pinela, J.; Prieto, M.A.; Barros, L.; Maria Carvalho, A.; Beatriz P.P. Oliveira, M.;

- Saraiva, J.A.; C.F.R. Ferreira, I. Cold extraction of phenolic compounds from watercress by high hydrostatic pressure: Process modelling and optimization. *Sep. Purif. Technol.* **2017**, doi:10.1016/j.seppur.2017.10.007.
101. Savic, I.M.; Savic Gajic, I.M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.). *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 2809–2818, doi:10.1007/s13197-020-04312-w.
  102. Chemat, F.; Abert Vian, M.; Fabiano-Tixier, A.S.; Nutrizio, M.; Režek Jambrak, A.; Munekata, P.E.S.; Lorenzo, J.M.; Barba, F.J.; Binello, A.; Cravotto, G. A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chem.* **2020**, *22*, 2325–2353, doi:10.1039/c9gc03878g.
  103. Oroian, M.; Ursachi, F.; Dranca, F. Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. *Ultrason. Sonochem.* **2020**, *64*, 105021, doi:10.1016/j.ultsonch.2020.105021.
  104. Tomšik, A.; Pavlič, B.; Vladić, J.; Ramić, M.; Brindza, J.; Vidović, S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrason. Sonochem.* **2016**, *29*, 502–511, doi:10.1016/j.ultsonch.2015.11.005.
  105. Kim, J.-H. Extraction time and temperature affect the extraction efficiencies of coumarin and phenylpropanoids from *Cinnamomum cassia* bark using a microwave-assisted extraction method. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1063*, 196–203, doi:10.1016/j.jchromb.2017.08.008.
  106. Sonar, M.P.; Rathod, V.K. Microwave assisted extraction (MAE) used as a tool for rapid extraction of Marmelosin from *Aegle marmelos* and evaluations of total phenolic and flavonoids content, antioxidant and anti-inflammatory activity. *Chem. Data Collect.* **2020**, *30*, 100545, doi:10.1016/j.cdc.2020.100545.
  107. AOAC AOAC *Official Methods of Analysis*; 16th ed.; 1995; Vol. 1; ISBN 9780935584752.
  108. AFNOR *Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes, jus de fruits / Association française de normalisation*; Paris, 1982; ISBN 2-12-336242-5 (Br.): 190 F.
  109. Garau, M.C.; Simal, S.; Rossello, C.; Femenia, A. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1014–1024, doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.009.
  110. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356, doi:10.1021/ac60111a017.
  111. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254, doi:10.1006/abio.1976.9999.

112. Gilly, M. Recherches sur le dosage de la cellulose. *Anal. Chim. Acta* **1956**, *14*, 53–56, doi:[https://doi.org/10.1016/0003-2670\(56\)80123-2](https://doi.org/10.1016/0003-2670(56)80123-2).
113. Albuquerque, B.R.; Prieto, M.A.; Filomena, M.; Rodrigues, A.; Curran, T.P.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration / microwave / ultrasound extraction techniques. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *95*, 404–415, doi:10.1016/j.indcrop.2016.10.050.
114. Goupy, J.; Creighton, L. *Introduction aux plans d'expériences*; 4eme édit.; Dunod, L'Usine Nouvelle: Paris, 2009; ISBN 978-2-10-052353-5.
115. Waterhouse, A.L. Determination of Total Phenolics. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2003; p. II.1.1.-II.1.8 ISBN 9780471142911.
116. Woisky, R.G.; Salatino, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* **1998**, *37*, 99–105, doi:10.1080/00218839.1998.11100961.
117. Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Rev. Génie Ind.* **2009**, 25–39.
118. BLOIS, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200, doi:10.1038/1811199a0.
119. Oyaizu, M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr. Diet.* **1986**, *44*, 307–315, doi:10.5264/eiyogakuzashi.44.307.
120. Koleva, I.I.; van Beek, T. a; Linssen, J.P.H.; de Groot, A.; Evstatieva, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 8–17, doi:10.1002/pca.611.
121. Yang, J.; Guo, J.; Yuan, J. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 1060–1066, doi:10.1016/j.lwt.2007.06.010.
122. Rouessac, F.; Rouessac, A. Analyse Chimique. In *Analyse chimique-Méthodes et techniques instrumentales modernes*; Paris, 2014; pp. 36–59.
123. de Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.M.A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 31–63, doi:10.1016/j.chroma.2006.01.019.
124. Hoffmann, E. De; Stroobant, V. *Spectrométrie de masse*; 3ème édit.; Paris, 2005;
125. Kumar, S.; Singh, A.; Kumar, B. Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *J. Pharm. Anal.* **2017**, *7*, 214–222, doi:10.1016/j.jpha.2017.01.005.
126. Cherfia, R.; Zaiter, A.; Akkal, S.; Chaimbault, P.; Abdelwahab, A.B.; Kirsch, G.; Kacem Chaouche, N. New approach in the characterization of bioactive compounds

- isolated from *Calycotome spinosa* (L.) Link leaves by the use of negative electrospray ionization LITMS, LC-ESI-MS/MS, as well as NMR analysis. *Bioorg. Chem.* **2020**, *96*, 103535, doi:10.1016/j.bioorg.2019.103535.
127. Rajawat, J.; Jhingan, G. Mass spectroscopy. In *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*; Elsevier, 2019; pp. 1–20 ISBN 9780128165485.
  128. Fabre, N.; Rustan, I.; Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 707–715, doi:10.1016/S1044-0305(01)00226-4.
  129. Hvattum, E.; Ekeberg, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 43–49, doi:10.1002/jms.398.
  130. Justino, G.C.; Borges, C.M.; Florêncio, M.H. Electrospray ionization tandem mass spectrometry fragmentation of protonated flavone and flavonol aglycones: a re-examination. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 237–248, doi:10.1002/rcm.3869.
  131. Tadonki, C.; Meyer, F.; Irigoin, F. Dendrogram Based Algorithm for Dominated Graph Flooding. *Procedia Comput. Sci.* **2014**, *29*, 586–598, doi:10.1016/j.procs.2014.05.053.
  132. Ponce, A.G.; Fritz, R.; del Valle, C.; Roura, S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Sci. Technol.* **2003**, *36*, 679–684, doi:10.1016/S0023-6438(03)00088-4.
  133. Paris, R.R.; Moyse, H. *Précis de matière médicale*; Masson, V1.; Paris, 1965;
  134. Sáenz, C.; Sepúlveda, E.; Pak, N.; Lecaros, M. Chemical and physical characterization of cactus cladode (*Opuntia Ficus-Indica*) powder. *Ital. J. Food Sci.* **2010**, *22*, 416–422.
  135. Ammar, I.; Ennouri, M.; Bali, O.; Attia, H. Characterization of two prickly pear species flowers growing in Tunisia at four flowering stages. *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, *59*, 448–454, doi:10.1016/j.lwt.2014.05.002.
  136. Ayadi, M.A.; Abdelmaksoud, W.; Ennouri, M.; Attia, H. Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Ind. Crops Prod.* **2009**, *30*, 40–47, doi:10.1016/j.indcrop.2009.01.003.
  137. Figuerola, F.; Hurtado, M.L.; Estévez, A.M.; Chiffelle, I.; Asenjo, F. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chem.* **2005**, *91*, 395–401, doi:10.1016/j.foodchem.2004.04.036.
  138. Sivasankar, S.; Mohanraj, R. Sweet Potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) - A Valuable Medicinal Food: A Review. *J. Med. Food* **2014**, *17*, 733–741, doi:10.1089/jmf.2013.0089.
  139. Shahidi, F.; Janitha, P.K.; Wanasundara, P.D. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *32*, 67–103, doi:10.1080/10408399209527581.

140. Minhaj, M.; EL Jemli, Y.; Taourirte, M.; Bouyazza, L. Preliminary phytochemical screening , total phenolic , flavonoids and polysaccharides contents and antioxidant capacity of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Opuntia ficus-barbarica* flowers. *J. Mater. Environ. Sci.* **2019**, *10*, 1369–1381.
141. Nkhili, E.; Tomao, V.; El Hajji, H.; El Boustani, E.-S.; Chemat, F.; Dangles, O. Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols. *Phytochem. Anal.* **2009**, *20*, 408–415, doi:10.1002/pca.1141.
142. Mahomoodally, M.F.; Gurib-Fakim, A.; Subratty, A.H. Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. *Pharm. Biol.* **2005**, *43*, 237–242, doi:10.1080/13880200590928825.
143. Liang, J.; Chen, S.; Chen, J.; Lin, J.; Xiong, Q.; Yang, Y. Therapeutic roles of polysaccharides from *Dendrobium O ffi cinaleon colitis* and its underlying mechanisms. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *185*, 159–168, doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.013.
144. Ji, X.; Peng, Q.; Wang, M. Anti-colon-cancer effects of polysaccharides: A mini-review of the mechanisms. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *114*, 1127–1133, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.186.
145. Liu, Y.; Zhang, J.; Meng, Z. Purification, characterization and anti-tumor activities of polysaccharides extracted from wild *Russula griseocarnosa*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 1054–1060, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.093.
146. Wang, Y.; Huang, M.; Sun, R.; Pan, L. Extraction, characterization of a Ginseng fruits polysaccharide and its immune modulating activities in rats with Lewis lung carcinoma. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *127*, 215–221, doi:10.1016/j.carbpol.2015.03.070.
147. Zhang, S.; Li, X. Hypoglycemic activity in vitro of polysaccharides from *Camellia oleifera* Abel. seed cake. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *115*, 811–819, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.054.
148. Zhang, Y.; Wu, Y.T.; Zheng, W.; Han, X.X.; Jiang, Y.H.; Hu, P.L.; Tang, Z.X.; Shi, L.E. The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from *Cordyceps cicadae*. *J. Funct. Foods* **2017**, *38*, 273–279, doi:10.1016/j.jff.2017.09.047.
149. Kharrat, N.; Salem, H.; Mrabet, A.; Aloui, F.; Triki, S.; Fendri, A.; Gargouri, Y. Synergistic effect of polysaccharides, betalain pigment and phenolic compounds of red prickly pear (*Opuntia stricta*) in the stabilization of salami. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 561–568, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.025.
150. Xu, D.-P.; Zhou, Y.; Zheng, J.; Li, S.; Li, A.-N.; Li, H.-B. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Flower of *Jatropha integerrima* by Response Surface Methodology. *Molecules* **2015**, *21*, 18, doi:10.3390/molecules21010018.
151. Zhang, L.; Jiang, Y.; Pang, X.; Hua, P.; Gao, X.; Li, Q.; Li, Z. Simultaneous Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction for Flavonoids and Antioxidant Activity of *Angelica keiskei* Using Response Surface Methodology (RSM). *Molecules*



**2019**, *24*, 3461, doi:10.3390/molecules24193461.

152. Belwal, T.; Ezzat, S.M.; Rastrelli, L.; Bhatt, I.D.; Daglia, M.; Baldi, A.; Devkota, H.P.; Orhan, I.E.; Patra, J.K.; Das, G.; et al. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *100*, 82–102, doi:10.1016/j.trac.2017.12.018.
153. Rouhani, M. Modeling and optimization of ultrasound-assisted green extraction and rapid HPTLC analysis of stevioside from *Stevia Rebaudiana*. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *132*, 226–235, doi:10.1016/j.indcrop.2019.02.029.
154. Guo, X.; Ye, X.; Sun, Y.; Wu, D.; Wu, N.; Hu, Y.; Chen, S. Ultrasound Effects on the Degradation Kinetics, Structure, and Antioxidant Activity of Sea Cucumber Fucoidan. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1088–1095, doi:10.1021/jf404717y.
155. Carciochi, R.A.; Manrique, G.D.; Dimitrov, K. Optimization of antioxidant phenolic compounds extraction from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 4396–4404, doi:10.1007/s13197-014-1514-4.
156. Clifford, M.N.; Knight, S.; Kuhnert, N. Discriminating between the Six Isomers of DicaFFEoylquinic Acid by LC-MS n. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3821–3832, doi:10.1021/jf050046h.