

THESE DE DOCTORAT en SCIENCES

Domaine : Sciences de la Nature & de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Nutrition et Santé

THEME

Les Propriétés Biologiques d'Extraits des Cladodes d'*Opuntia ficus indica* (L.)

Présentée

Par

MOUSSAOUI BADREDDINE

Soutenue le2020 devant le jury d'examen composé de :

Président :	Pr Larid Mohamed	Univ. Mostaganem
Examineurs:	Pr Slimani Miloud	Univ. Saida
	Pr Boualga Ahmed	Univ. Oran 1
	Dr Tefiani Choukri (MCA)	Univ. Tlemcen
	Dr Benahmed Nadjia (MCA)	Univ. STO
Directeur de thèse :	Pr Riazi Ali	Univ. Mostaganem

Année universitaire : 2019-2020

Dédicaces

A ma grand-mère

A mes chers parents

A mon épouse Fatiha et à mes enfants: Arwa, Otba et Khatoun

A mes frères et sœurs et à toute ma famille; spécialement Kheira et Ahmed

A tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Badreddine

Avant-propos

La présente thèse a été réalisée conjointement au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la santé (LMBAFS) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, et au Laboratoire de Toxicologie de la faculté de pharmacie de l'Université de Porto, Portugal.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Professeur A. Riazi, Directeur du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS), à qui je dois toute ma formation du magister au doctorat. Je le remercie grandement pour sa patience, sa confiance, ses encouragements permanents et pour les enseignements qu'il m'a prodigué tout au long de ces années.

Mes sincères remerciements sont destinés à Mr. Larid Mohamed, Professeur et directeur du laboratoire de Biodiversité, conservation de l'eau et des sols à l'Université de Mostaganem, pour m'avoir honoré en acceptant de présider le jury de ma soutenance.

J'adresse mes respectueux remerciements à Mr. Boualga Ahmed, Professeur et directeur du laboratoire de nutrition métabolique et clinique à l'Université Ahmed Benbella d'Oran 1, de bien avoir participé à ce jury.

Mes vifs remerciements vont également à Mr. Slimani Miloud, Professeur à l'Université Moulay Tahar de Saida, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie pleinement le Dr Tefiani Choukri, maître de conférences de classe A à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté d'apporter ses critiques scientifiques à ce travail .

J'adresse aussi mes sincères remerciements au Dr. Benahmed Nadjia, maître de conférences de classe A à l'Université des sciences et de la technologie Mohamed Boudiaf (USTO), d'avoir accepté de participer à ce jury.

Ma profonde gratitude est adressée à Diana Dias Da Silva et Nelson Goncalo, Docteurs à l'Université de Porto (Portugal) pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire. Je vous remercie infiniment pour votre gentillesse, vos conseils et pour la mise à ma disposition de tous les moyens dont vous vous disposez.

Enfin, je remercie vivement tous ceux qui ont participé directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Moussaoui Badreddine

Mostaganem, septembre 2020

Résumé

Cette étude a pour but d'extraire et caractériser les métabolites secondaires des nopals de l'*Opuntia* d'Algérie, et d'évaluer leurs propriétés biologiques. Le protocole exécuté fait appel à diverses méthodes de dosage, de fractionnement chromatographique (HPLC et CPG-MS) et de mesure du pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobien, anticoagulant et antitumoral. Les résultats montrent que les nopals sont riches en eau, fibres, calcium et en vitamine C. Les polyphénols, les caroténoïdes, les bétalaïnes et les alcaloïdes étaient présents aux teneurs respectives de 6354 ± 113.27 , 13.69 ± 1.72 , 48.13 ± 2.2 et 596.60 ± 8.71 mg/100g de matière sèche. L'analyse chromatographique a mis en évidence 57 composés phénoliques et 17 alcaloïdes; dont l'acide gallique, la quercétine, le kaempferol, la naringenine, la glucobrassicine. Les résultats de l'activité antioxydante ont montré que les polyphénols sont les meilleurs piègeurs des radicaux DPPH (2,2-Diphényl -1-picrylhydrazyl) ($IC_{50} = 84.8 \mu\text{g/mL}$); tandis que les caroténoïdes assurent un meilleur pouvoir réducteur FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) ($IC_{50} = 106.13 \mu\text{g/mL}$) et une action anti-lipoperoxydation (blanchiment du β -carotène) plus avantageuse ($IC_{50} = 37.57 \mu\text{g/mL}$). Un maximum d'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine sérique a été observé sous l'effet des polyphénols ($96.17 \pm 1.83\%$) et des bétalaïnes ($95.51 \pm 2.16\%$). Le niveau le plus élevé de protection des globules rouges humains vis-à-vis de l'hémolyse a été obtenu avec les caroténoïdes ($88.4 \pm 1.68\%$). Les valeurs des Temps de Prothrombine (TP) et de Thromboplastine Partielle Activée (APTT) observées indiquent une absence d'action anticoagulante des principes actifs de nopals. Seuls les extraits phénoliques de cladodes ont manifesté une activité antimicrobienne dont la concentration minimale inhibitrice (CMI) varient de 0.25 à 0.50mg/mL ; alors que celle à effets bactéricide (CBB) et fongicide (CMF) varient 0.5 à 1mg/mL. Une plus grande sensibilité des souches de *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* et de la levure *Candida albicans* a été observée ; alors que la souche bénéfique *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* a été résistante. Sur le plan de la cytotoxicité de ces extraits sur la lignée cancéreuse HepG2, ce sont les caroténoïdes qui ont été les plus efficaces avec une perte de viabilité de l'ordre de $50.77 \pm 6.51\%$ suite à l'inhibition du cytochrome CYP2E1. L'absence d'impact de tous les autres extraits sur la viabilité de cette lignée cellulaire a été révélée par le test MTT (réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) et celui d'inclusion lysosomale du rouge neutre. Cette famille moléculaire a stimulé une surproduction des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Les quatre classes phytochimiques ont eut un impact dépolarisant sur la membrane mitochondriale.

Mots clés: *Opuntia*, nopal, polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes, alcaloïdes, propriétés biologiques.

Abstract

The aim of this study is to extract and characterize the secondary metabolites of nopals of the Algerian *Opuntia*, and to evaluate their biological properties. The nopals were rich in water, fiber, calcium and vitamin C. Polyphenols, carotenoids, bétalaïns and alkaloids were present at respective levels of 6354 ± 113.27 , 13.69 ± 1.72 , 48.13 ± 2.2 and 596.60 ± 8.71 mg/100g of dry matter. Chromatographic analysis revealed 57 phenolic compounds, 17 alkaloids; including gallic acid, quercetin, kaempferol, naringenin, glucobrassicin. The results of the antioxidant activity showed that polyphenols are the best scavengers of DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals ($IC_{50} = 84.8 \mu\text{g/mL}$), while carotenoids are endowed with better reducing power in FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) ($IC_{50} = 106.13 \mu\text{g/mL}$) and a more advantageous anti-lipoperoxidation (β -carotene bleaching) action ($IC_{50} = 37.57 \mu\text{g / mL}$). The anti-inflammatory effect of the extracts was tested by the rate of protection of bovine serum albumin against denaturation and inhibition of hemolysis of erythrocytes. Polyphenols and bétalaïns have shown the maximum preservation of proteins (96.17 ± 1.83 and $95.51 \pm 2.16\%$). The erythrocyte membrane was better stabilized by carotenoids ($88.4 \pm 1.68\%$). The results of the Prothrombin Time (PT) and the Partial Activated Thromboplastin Time (APTT), revealed a lack of anticoagulant action for the active principles of nopals. Regarding the antimicrobial activity, the polyphenols presented the only extract with a positive effect, with a minimum inhibitory concentration (MIC) in the order of (0.25-0.5 mg/mL) and a minimum bactericidal concentration (CMB) and fungicidal concentration (CMF) ranging to (0.5-1 mg/mL). The strains *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* and the yeast *Candida albicans* were noted to be the most sensitive. The beneficial bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* was resistant. The study of the cytotoxicity of these extracts on the cancerous cell line HepG2 illustrated that the carotenoids were the most effective. No impact of all the extracts on cell viability was noted by the MTT test (reduction of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) as by lysosomal inclusion of neutral red. On the other hand, carotenoids led to a drop in viability to ($50.77 \pm 6.51\%$) after inhibition of cytochrome CYP2E1. This molecular family has stimulated an overproduction of reactive oxygenated and nitrosated species. The four phyto-chemical classes gave a depolarizing impact on the mitochondrial membrane.

Key words: *Opuntia*, nopal, polyphenols, carotenoids, bétalaïns, alkaloids, biological properties.

ملخص

تهدف هذه الدراسة الى استخراج وتوصيف المستقلبات الثانوية من الفروع اليانعة لنبات التين الشوكي المتواجد بالجزائر، وتقييم خصائصها البيولوجية. اثبتت النتائج ان الفروع اليانعة غنية بالماء والألياف والكالسيوم وفيتامين ج، كما ان البوليفينولات الكاروتينات، البيتاين والقلويدات وجدت بالنسب 113.27 ± 6354 ، 1.72 ± 13.69 ، 2.2 ± 48.13 و 8.71 ± 596.60 مجم/100 جرام من المادة الجافة، على التوالي. أظهر التحليل الكروماتوغرافي 57 مركبًا فينوليًا و 17 قلويًا، بما في ذلك حمض الغاليك، الكيرسيتين، الكايمفيرول، النارينجين و الجلوكوبراسيسين. أبانت نتائج النشاط المضاد للأكسدة أن البوليفينول هو أفضل مكلمب لجذور DPPH (22-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ($84.8=IC50$ ميكروغرام/مل)، في حين أن الكاروتينات تعتبر الاحسن من حيث القوة الارجاعية للحديد (FRAP) ($106.13=IC50$ ميكروغرام/مل) وتثبيط أكسدة الدهون (تبيض بيتا كاروتين) ($37.57=IC50$ ميكروغرام/مل). تم اختبار التأثير المضاد للالتهاب للمستخلصات بالنسبة لحماية بروتين زلال المصل البقري ضد التمسخ وتثبيط انحلال كريات الدم الحمراء، وقد أظهرت البوليفينولات والبيتاين القدر الأقصى من الحفاظ على البروتينات (1.83 ± 96.17 و 2.16 ± 95.51 %)، فيما كان استقرار غشاء كرات الدم الحمراء الأفضل عند وجود الكاروتينات (88.4 ± 1.68 %). أظهرت نتائج زمن البروثرومبين (PT) وزمن الثرومبوبلاستين الجزئي المنشط (APTT) عدم وجود تأثير مضاد للتخثر لهذه المكونات النشطة لفروع التين الشوكي. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للميكروبات، كانت البوليفينولات هي المستخلص الوحيد ذا التأثير الإيجابي، علما ان التركيز المثبط الأدنى (MIC) يتراوح بين (0.25-0.5 مجم/مل)، في وقت كان التركيزان مبيد الجراثيم الأدنى (CMB) ومبيد الفطريات الأدنى (CMF) يبلغان نسبة (0.5-1 مجم/مل)، وقد لوحظ أن سلالات *Bacillus cereus* و *Klebsiella pneumoniae* وخميرة *Candida albicans* هي الأكثر حساسية. كانت البكتيريا النافعة *Bifidobacterium animalis subsp lactis* مقاومة. أوضحت دراسة السمية الخلوية لهذه المستخلصات على الخلايا السرطانية HepG2 أن الكاروتينات هي الأكثر فعالية. لاحظنا عدم وجود تأثير لجميع المستخلصات على حياة الخلايا من خلال اختبار MTT (اختزال 3- (4،5)-ثنائي ميثيل ثيازول-2-يل) -2،5-ثنائي فينيل رباعي بروميد) وتلك الخاصة بالامتصاص الليزوزومي للأحمر المحاليد من ناحية أخرى، أدت الكاروتينات إلى انخفاض في نسب الخلايا الحية إلى (50.77 ± 6.51 %). بعد تثبيط السيتوكروم CYP2E1. إضافة الى ذلك، فقد حفزت هذه العائلة الجزيئية زيادة إنتاج الأنواع المؤكسجة والأزوتية التفاعلية. أعطت الفئات الكيميائية النباتية الأربعة تأثير إزالة الاستقطاب على غشاء الميتوكوندريا.

الكلمات المفتاحية : الأوبونتيا، الفروع اليانعة، البوليفينولات، الكاروتينات، البيتاين، القلويدات، الخصائص البيولوجية.

Liste des abréviations

\$	Dollar
€	Euro
$\Delta\psi_m$	Le potentiel de la membrane mitochondriale
°B	Degré Brix
°C	Degré Celsius
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μm	Micromètre
μS	Microsiemens
AFNOR	Association française de normalisation
AlCl_3	Trichlorure d'aluminium
AOAC	The Association of Official Analytical Chemists
APTT	Temps de thromboplastine partielle activée
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. adolescentis</i>	<i>Bifidobactérium adolescentis</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>Bifidobactérium bifidum</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BDE	Enthalpie de dissociation des liaisons
BHIB	Infusion cœur cerveau (Brain Heart Infusion Broth)
BSA	Albumine Sérique Bovine
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CAM	Crassulacean Acid Metabolism (métabolisme acide crassulacéen)
CDB	Conjugated Double Bound (double liaison conjuguée)
CE50	La concentration efficace médiane
cm	Centimètre
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMF	Concentration minimale fongicide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CYP	Cytochromes P450
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DO	Densité optique
DPPH	2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAG	Equivalent acide gallique

EAT	Equivalent Acide Tannique
ECCG	Epigallocatechine gallate
ECG	Epigallocatechine
EDTA	Éthylène diamine tétraacétique
ER	Equivalent rutine
FeCl₃	Chlorure de fer
FRAP	Pouvoir antioxydant par réduction ferrique (Ferric Reducing Antioxydant Power)
g	Gramme
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée au spectre de masse
GST	Glutathion S-transférase
h	Heure
Ha	Hectare
HAT	Transfert d'atomes d'hydrogène (Hydrogen Atom Transfer)
HCl	Acide chlrohydrique
HepG2	La lignée cancéreuse des hépatocytes humains
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRBC	Erythrocytes humains (Human Red Blood Cells)
I₂	Diode
IC50	Concentration inhibitrice 50%
IP	Potentiel d'ionisation
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kcal	Kilo-calorie
kg	Kilogramme
LDL	Les lipoprotéines de basse densité (low density lipoprotein)
m/v	Masse/volume
m	Mètre
M	Molarité
MDR	pompes à résistance multidroque (Multidrug Resistance Pumps)
MET	Le transporteur d'efflux multidroque
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mol	Mole
MRS	Gélose de Man, Rogosa, Sharpe
MS	Matière sèche

MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
N	Normalité
NaCl	Chlorure de sodium
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	Nanomètre
OCT	Transporteurs de cations organiques
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PF	Poids frais
pH	Potentiel d'hydrogène
PT	Temps de prothrombine
EQ	Equivalent quercétine
RN	Rouge neuter (Chlorure de 3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine)
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
rpm	Rotation par minute
SET	Transfert mono-électronique (single electron transfer)
TCK	Temps de Céphaline-Kaolin
TMRE	Ester éthylique de tétraméthylrhodamine
TQ	Temps de Quick
tr	Tour
U	Unité
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultraviolet
v/v	Volume/volume
x g	Vitesse rotationnelle en gravité multipliée

Liste des tableaux

Chapitre I: Généralités sur le figuier de Barbarie

Tableau 1: Principaux composants des cladodes du figuier de Barbarie (Stintzing et Carle, 2005).....	16
Tableau 2: Tableau récapitulatif de la composition des cladodes de <i>O. ficus indica</i> en monosaccharides non cellulosiques, en acides organiques à deux moments de la récolte, en minéraux, en acides aminés et en acides gras (Stintzing et Carle, 2005; Abidi <i>et al.</i> , 2009; Ginestra <i>et al.</i> , 2009; El Kharrassi, 2015).....	20

Chapitre III. Résultats et Discussion

Tableau 3: Caractéristiques physicochimiques et biochimiques des nopals d' <i>O. ficus indica</i> d'Algérie.	40
Tableau 4: Distribution des principaux polyphénols dans les nopals inermes d' <i>O. ficus indica</i> d'Algérie.	45
Tableau 5: Profil en bétalaïnes, alcaloïdes et caroténoïdes des nopals inermes d' <i>O. ficus indica</i> d'Algérie.....	45
Tableau 6: Profil chromatographique HPLC des composés phénoliques identifiés dans l'extrait de jeunes nopals de Tissemsilt (Algérie) par comparaison aux étalons.	52
Tableau 7: Profil chromatographique CG-MS des alcaloïdes identifiés dans l'extrait de nopals d' <i>Opuntia</i> de Tissemsilt-Algérie	54
Tableau 8: Capacité de piégeage du radical libre DPPH par les polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes des nopals exprimée en IC50.....	56
Tableau 9: Pouvoir réducteur FRAP des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes des nopals exprimé en IC50	63
Tableau 10: Blanchiment du β -carotène exprimé en IC50 en présence des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes des nopals d'Algérie.....	68
Tableau 11: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance de différentes souches exposées à une concentration de 2mg/mL d'extrait phénolique de jeunes nopals d' <i>Opuntia</i> d'Algérie.....	90
Tableau 12: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide/fongicide (CMB/CMF) de l'extrait phénolique de jeunes nopals d' <i>Opuntia</i> d'Algérie.....	95
Tableau 13: Comparaison des effets cytotoxiques moyens et maximaux des quatre extraits de nopals pour les tests MTT et NR.....	105

Liste des figures

Chapitre I: Généralités sur le figuier de Barbarie

Figure 1: Distribution géographique mondiale d' <i>Opuntia spp</i> (Sáenz <i>et al.</i> , 2013)	3
Figure 2: Les différentes parties du Fiquier de Barbarie (Benattia, 2017; Inglese, 2018; Cliché Moussaoui, 2019)	5
Figure 3: Emballage des figues de Barbarie et des nopals destinés à la consommation humaine (Inglese, 2018)	8
Figure 4: Images de certains produits issus du figuier de Barbarie (Inglese, 2018)	8
Figure 5: Morphologie du cladodes de figuier de Barbarie: (E) épiderme, (C) chlorenchyme, (V) vaisseaux conducteurs et (P) parenchyme (Ginestra <i>et al.</i> , 2009; Malainine <i>et al.</i> , 2001)	11
Figure 6: Morphologie d'une stomate entouré par des druses (à gauche) et d'un canal de mucilage (à droite) (Olvera et Romero, 2006; Inglese, 2018).....	15
Figure 7: Morphologie d'une aréole de cladode présentant deux épines, une feuille éphémère et plusieurs glochides brunâtres (Malainine <i>et al.</i> , 2001; Salem-Fnayou <i>et al.</i> , 2014; Inglese, 2018)	15

Chapitre III. Résultats et Discussion

Figure 8: Chromatogramme des polyphénols de jeunes nopals d' <i>Opuntia</i> de Tissemsilt (Algérie).....	52
Figure 9: Chromatogramme des alcaloïdes de jeunes nopals d' <i>Opuntia</i> de Tissemsilt (Algérie).....	54
Figure 10: Capacité de piégeage du radical libre DPPH par les polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes de jeunes nopals de l' <i>Opuntia</i> d'Algérie, utilisés à différentes concentrations (31.25, 62.5, 125 et 250 µg/mL) et comparés à l'acide ascorbique comme standard positif (Les résultats sont exprimés par la moyenne ±SD de trois mesures).....	57
Figure 11 : Pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP) des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et des alcaloïdes de nopals de l' <i>Opuntia</i> d'Algérie, utilisés-à différentes concentrations (15.75, 31.25, 62.5, 125 et 250 µg/mL) et comparés à l'acide ascorbique comme standard positif (Les résultats représentent la moyenne ±SD de trois mesures).....	64
Figure 12: Cinétique de blanchiment du β-carotène en présence des A) polyphénols, B) caroténoïdes, C) bétalaïnes et D) alcaloïdes de nopals de l' <i>Opuntia</i> d'Algérie, utilisés à différentes concentrations (31.25, 62.5, 125 et 250 µg/mL) et comparés à l'acide ascorbique comme standard positif (Les résultats représentent la moyenne ±SD de trois mesures).	69
Figure 13 : Taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA) par différentes concentrations (15.75, 31.25, 62.5, 125 et 250 µg/mL) d'extraits de	

polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et d'alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie comparé aux mêmes concentrations de médicament standard, le diclofenac de sodium. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures, les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%).74

Figure 14: Inhibition de l'hémolyse érythrocytaire par stabilisation de la membrane en présence de différentes concentrations (15.75, 31.25, 62.5, 125 et 250 μ g/mL) d'extraits de polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et d'alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie comparés au médicament diclofénac comme anti-inflammatoire standard, le diclofenac de sodium, utilisé aux mêmes concentrations. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.78

Figure 15 : Activité anticoagulante de différentes concentrations (31.25, 62.5, 125 et 250 μ g/mL) d'extraits de polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et d'alcaloïdes de jeunes nopals de l'*Opuntia* d'Algérie, comparée à celle des mêmes concentrations d'héparine comme anticoagulant standard, sur la voie exogène par temps de prothrombine "PT". Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.....84

Figure 16: Activité anticoagulante de différentes concentrations (31.25, 62.5, 125 et 250 μ g/mL) d'extraits de polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et d'alcaloïdes de jeunes nopals de l'*Opuntia* d'Algérie, comparée à celle des mêmes concentrations d'héparine comme anticoagulant standard, sur la voie endogène par temps de thromboplastine partielle activée "APTT". Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.84

Figure 17 : Effet cytotoxique des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie, utilisés aux concentrations de 0.25, 0.5 et 1 mg/mL, sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode de réduction du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT). Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.100

Figure 18: Effet cytotoxique (en % de prolifération cellulaire) de différentes concentrations (0.25, 0.5 et 1 mg/mL) en polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et en alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode d'inclusion lysosomale du rouge neutre. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures, ns: non significatif par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.104

Figure 19: Effet cytotoxique (en % de prolifération cellulaire) de différentes concentrations (0.25, 0.5 et 1 mg/mL) de polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes bétalaïnes et d'alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode de réduction du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) après inhibition des A) cytochromes CYP2D6 par la quinidine et B)

CYP2E1 par la metyrapone. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%, ns: non significatif par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.....108

Figure 20: Influence des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* Algérien, utilisés en concentrations (0.25, 0.5 et 1 mg/mL) sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NOS) par les cellules tumorales HepG2 (Les résultats sont la moyenne \pm SD de trois mesures, les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%).....111

Figure 21: Effet de différentes concentrations (0.25, 0.5 et 1 mg/mL) en polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie sur le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) des cellules tumorales HepG2. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.116

Table des matières

« Propriétés biologiques d'extraits des cladodes d'*Opuntia ficus indica* L. »

Dédicaces

Avant-propos

Résumé

Abstract

Résumé en arabe

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Chapitre I: Généralités sur le figuier de Barbarie

I.1. Répartition géographique et importance économique.....	2
I.2. Aspects botaniques	3
I.3. Utilisations des différentes parties du figuier de Barbarie	6
I.3.1. Alimentation humaine	6
I.3.2. Alimentation animale	7
I.3.3. Utilisation thérapeutique	7
I.4. Focus sur les cladodes du figuier de Barbarie.....	9
I.4.1. Anatomie et histologie des cladodes	9
I.4.1.1. La peau	10
I.4.1.2. Le cortex.....	11
I.4.1.3. Les tissus vasculaires	12
I.4.1.4. La moelle.....	12
I.4.1.5. Les stomates	12
I.4.1.6. Les aréoles.....	12
I.4.1.7. Cellules mucilagineuses	13
I.4.1.8. Epines et glochides.....	13
I.4.2. Composition chimique des cladodes	16
I.4.2.1. Macrocomposition.....	16
I.4.2.1.1. L'eau et les minéraux.....	16
I.4.2.1.2. Glucides.....	17
I.4.2.1.3. Protéines	17
I.4.2.1.4. Lipides	17
I.4.2.1.5. Acides organiques	18
I.4.2.2. Microcomposition	18
I.4.2.2. 1. Les vitamines	18
I.4.2.2. 2. Les caroténoïdes et les chlorophylles.....	18
I.4.2.2.3. Les substances phénoliques.....	18
I.4.2.2.4. Les alcaloïdes	19
I.4.2.2.5. Les bêtaïnes	19

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal : préparation du cladode à l'analyse	21
II.2. Les souches bactériennes et fongiques utilisées	21
II.3. Analyse physico-chimique du cladode	22
II.3.1. Humidité	22
II.3.2. Les cendres.....	22
II.3.3. pH.....	22
II.3.4. Détermination du taux de solides solubles.....	22
II.3.5. Détermination de la conductivité	23
II.3.6. Dosage des glucides	23
II.3.7. Dosage des lipides	23
II.3.8. Dosage des protéines.....	24
II.3.9. Détermination de la teneur en fibres	24
II.3.10. Dosage de la vitamine C	25
II.3.11. Dosage des minéraux	25
II.3.12. Dosage de la chlorophylle.....	26
II.4. Méthodes d'analyse des métabolites secondaires	26
II.4.1. Méthodes d'analyse des substances phénoliques.....	26
II.4.1.1. Extraction des substances phénoliques	26
II.4.1.2. Dosage des polyphénols totaux.....	27
II.4.1.3. Dosage des flavonoïdes totaux.....	27
II.4.1.4. Dosage des flavones et flavonols	27
II.4.1.5. Dosage des tannins condensés	28
II.4.1.6. Dosage des tannins hydrolysables	28
II.4.2. Méthode d'extraction et de dosage des bétalaines.....	28
II.4.3. Méthode d'extraction et de dosage des caroténoïdes.....	29
II.4.4. Méthode d'extraction et de dosage des alcaloïdes.....	29
II.4.5. Fractionnement et analyse qualitative des métabolites secondaires d'extrait de cladode par chromatographie.....	30
II.4.5.1. Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)	30
II.4.5.2. Analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG- MS).....	30
II.5. Méthodes d'évaluation des propriétés biologiques d'extrait de cladodes	31
II.5.1. Détermination de l'activité antioxydante.....	31
II.5.1.1. Par la méthode de piégeage du radical libre le 2, 2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH°).....	31
II.5.1.2. Par la méthode du « Ferric reducing antioxydant power » (FRAP)	31
II.5.1.3. Par le test du blanchiment du β -carotène	32
II.5.2. Détermination de l'activité anti-inflammatoire	32
II.5.2.1. Par le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA)	32
II.5.2.2. Par le test de stabilité de la membrane des globules rouges humains vis-à-vis de l'hémolyse (HRBC: Human Red Blood Cell membrane stability test).....	33
II.5.3. Détermination de l'activité anticoagulante	34
II.5.3.1. Par la détermination du Temps de Céphaline-Kaolin (TCK) ou Temps partiel de thromboplastine activée (APTT)	34
II.5.3.2. Par la détermination du Temps de Quick (TQ) ou Temps de Prothrombine (TP).....	34
II.5.4. Détermination de l'activité antimicrobienne	34
II.5.4.1. Réactivation des souches	34
II.5.4.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose.....	35

II.5.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	35
II.5.4.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) et fongicide (CMF).....	36
II.5.5. Détermination de l'activité anti-tumorale de l'extrait de cladode	36
II.5.5.1. Nature, origine et technique de mise en culture des cellules tumorales HepG2.....	36
II.5.5.2. Choix des doses d'extrait de cladodes et durée de leur confrontation aux cellules tumorales HepG2.....	36
II.5.5.3. Evaluation de la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode de réduction du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)	37
II.5.5.4. Evaluation de la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode d'inclusion lysosomale du rouge neutre	37
II.5.5.5. Détermination du taux d'inhibition du cytochrome P450	38
II.5.5.6. Détermination du taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NOS)	38
II.5.5.7. Détermination du potentiel membranaire mitochondrial.....	39
II.6. Analyse statistique des résultats	39

Chapitre III. Résultats et Discussion

III.1. Macrocomposition et caractéristiques physicochimiques du nopal d'Algérie	40
III.1.1. Humidité, taux de cendres et minéraux	40
III.1.2. pH, conductivité et solides solubles	41
III.1.3. Sucres, protéines et lipides	42
III.1.4. Fibres brutes et pectines	42
III.1.5. Vitamine C.....	43
III.1.6. La chlorophylle	43
III.2. Microcomposition phytochimique des extraits de nopals	45
III.2.1. Polyphénols	45
III.2.1.1. Teneur des polyphénols totaux	45
III.2.1.2. Flavonoïdes totaux, flavones et flavonols	47
III.2.1.3. Tannins condensés et tannins hydrolysables	48
III.2.2. Bétalaïnes.....	49
III.2.3. Caroténoïdes	50
III.2.4. Alcaloïdes	50
III.3. Profil chromatographique des extraits de nopals.....	51
III.3.1. Identification des polyphénols par HPLC	51
III.3.2. Identification des alcaloïdes par CG-MS.....	53
III.4. Propriétés biologiques des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes des nopals d'Algérie.....	55
III.4.1. Activité antioxydante.....	55
III.4.1.1. Piégeage du radical libre DPPH	56
III.4.1.2. Le pouvoir réducteur (FRAP).....	63
III.4.1.3. Taux d'inhibition du blanchiment du β -carotène	67
III.4.2. Activité anti-inflammatoire	73
III.4.2.1. Pouvoir inhibiteur de la dénaturation de l'albumine bovine sérique	73
III.4.2.2. Stabilisation de la membrane des érythrocytes humains	77
III.4.3. Activité anticoagulante	82
III.4.3.1. Effet des extraits de nopals sur le Temps de Quick (TQ) ou Temps de Prothrombine (TP) et le Temps de Céphaline-Kaolin (TCK) ou Temps partiel de thromboplastine activée (APTT).....	83

III.4.4. Activité antimicrobienne	88
III.4.4.1. Diamètres des zones d'inhibition des microorganismes exposés à l'extrait de cladodes.....	88
III.4.4.2. Niveaux des concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)	94
III.4.5. Cytotoxicité des métabolites de nopals de l' <i>Opuntia</i> d'Algérie	98
III.4.5.1. Effet des métabolites de nopals sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode de réduction du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)	99
III.4.5.2. Effet des métabolites de nopals sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode d'inclusion lysosomale du rouge neutre.....	103
III.4.5.3. Effet des métabolites de nopals sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 après inhibition du cytochrome P450	106
III.4.5.4. Influence des métabolites de nopals sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NOS) par les cellules tumorales HepG2.....	110
III.4.5.5. Effet des métabolites de nopal sur le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$).....	114
Conclusion	119
Références bibliographiques	121
Publication	155

Introduction

Introduction

L'utilisation des plantes médicinales par l'homme est une pratique antique que la recherche médicale moderne redécouvre aujourd'hui avec un intérêt grandissant dans différents domaines (**El Hachimi et al., 2017**). L'Algérie est un vaste territoire riche en flore et encore vierge. Toutes ces plantes qu'il recèle représentent une bonne source en principes actifs pour les secteurs médico-pharmaco-cosmétiques.

Le figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica* (L.)), en fait un exemple typique de cette fortune végétale encore délaissée localement suite aux attitudes d'ignorance dont la communauté connaisseuse y participe pour une grande part. Ces cactus sont de véritables survivants à la sécheresse et aux conditions drastiques des climats arides et semi-arides, grâce à leurs capacités adaptatives étonnantes incluant des mutations morphologiques jumelées à des métamorphoses physiologiques et métaboliques. Dès lors, ces plantes font l'objet des projets de développement agricole et de programmes d'aménagement rural dans d'autres pays (**Arba et al., 2000**).

A l'égard de ses fruits délicieux, la partie végétative aplatie nommée cladode, notamment celle en jeune stade de croissance, ne manque pas d'intérêt au vu de ses qualités nutritives et fonctionnelles mais surtout de son capital phytochimique. La vulgarisation de l'usage de ces jeunes cladodes appelés nopals légumes, passe inévitablement par leur réhabilitation scientifique comme mesure informative rationnelle sur son importance socio-économique.

C'est dans cette optique que s'inscrit l'objectif de cette thèse, qui consiste à extraire les molécules naturelles bioactives des nopals d'Algérie, telles que les polyphénols, les caroténoïdes, les bêtaïnes et les alcaloïdes, et de procéder à leurs propriétés biologiques.

Le premier chapitre de cette thèse est un rappel bibliographique descriptif du figuier de Barbarie, sur le plan de l'anatomie et la composition chimique du cladode. Le deuxième chapitre décrit la méthodologie mise en œuvre pour une détermination de la composition relativement complète des extraits de cladodes, une identification et une quantification des composés bioactifs ; ainsi qu'une démonstration de leurs principales propriétés biologiques d'intérêt santé.

Le troisième et dernier chapitre présentera les principaux résultats de ce travail avec leur confrontation à ce qui a été accumulé comme connaissances sur le sujet.

Chapitre I

Généralités sur le figuier de

Barbarie

Chapitre I: Généralités sur le figuier de Barbarie

I.1. Répartition géographique et importance économique

Le figuier de Barbarie a évolué et s'est adapté presque à toutes sortes de biotopes, allant des zones désertiques sous le niveau de la mer aux zones de haute altitude telles que les Andes péruviennes et des régions tropicales du Mexique, où les températures sont toujours supérieures à 5 °C, aux régions glaciales du Canada qui peuvent tomber à - 40 °C en hiver (**Nobel, 1999**).

Sa distribution géographique très large s'étale de son continent originaire l'Amérique, vers l'Afrique, l'Asie, l'Europe et l'Océanie (fig.1) (**Casas et Barbera, 2002**). Il est par essence développé sur la partie ouest de la Méditerranée ; le sud de l'Espagne, le Portugal et l'Afrique du Nord (**Salem et al., 2002; Arba, 2009**).

En Algérie, à l'exception des montagnes et des zones sahariennes, la culture algérienne du cactus est largement représentée dans le paysage rural en plantation plus au moins régulières, autour des villages, en haies limitant les parcelles de culture ou de vergers (**Arba et al., 2000**). Du centre à l'ouest, on le trouve sur les wilayas de Boumerdès, Blida, Tipaza, Tissemsilt, Chlef, Relizane, Mostaganem, Ain-Témouchent, Oran, Mascara, Sidi-bel Abbès et Tlemcen (**Benattia, 2017**).

Ce cactus est considéré comme l'une des espèces les plus rentables grâce à sa polyvalence d'usage qui procure des bénéfices économiques évidents et génère avantageusement des revenus et des emplois au profit des habitants (**Neffar, 2012**).

Soberón et al. (2001) avaient rapporté que le marché Mexicain d'exportation des produits *Opuntia* évalué sur une période de 8 ans s'élevait à 50 millions \$/an, répartis en 27 millions pour les nopals légumes, 20 millions pour les poires et enfin 1 million pour le foin. Le revenu annuel moyen à l'ha a été 2000 à 6000 \$ en Italie, entre 1088 et 3266 \$ au Maroc et 5251 \$ au Chili (**Arba et al., 2000; Inglese, 2018**).

L'évaluation économique de la production du fruit d'*Opuntia* faite par **García et al. (2020)**, montre des bénéfices moyens respectifs de 340, 1658.88 et 545.801 €/ha au Mexique, en Italie et en Espagne. Cependant, ces auteurs soulignent l'absence des données sur la valeur économique d'*Opuntia* basée sur ses composés biofonctionnels, médicinaux, nutraceutiques et cosmétiques. A titre d'exemple, un bioactif comme le kaempférol atteint une valeur de 213.68 € pour 20 mg tandis que l'isorhamnétine vaut 204,53 € pour 10 mg (**García et al., 2020**).

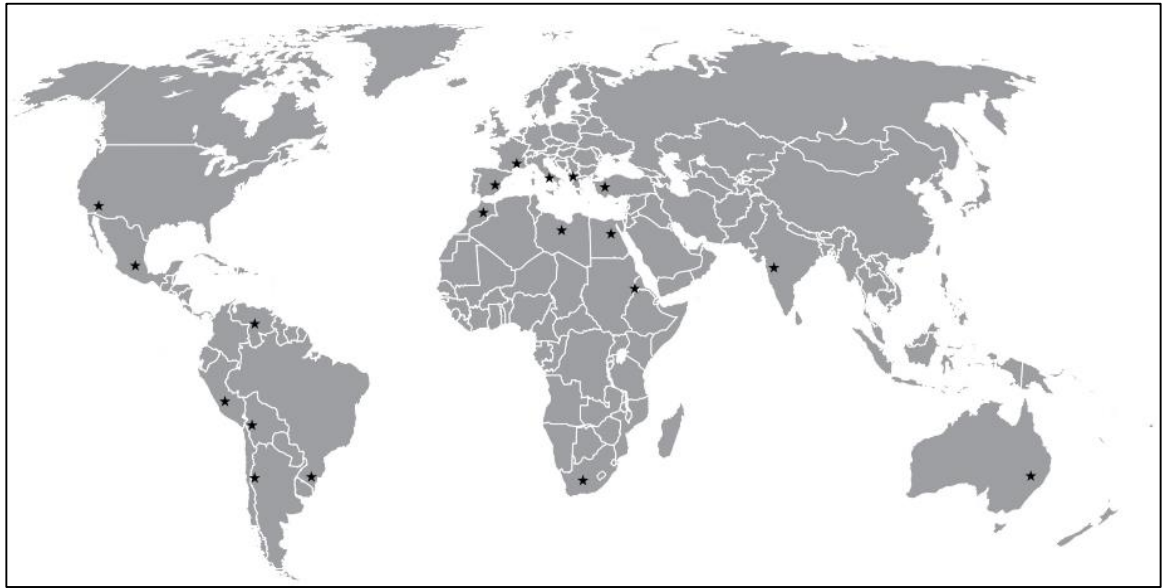


Figure 1: Distribution géographique mondiale d'*Opuntia* spp (Sáenz *et al.*, 2013).

I.2. Aspects botaniques

L'Opuntia spp communément appelée figuier de Barbarie ou cactus Nopal, est une plante angiosperme dicotylédone tropicale et subtropicale, intégrée à la famille des *Cactaceae*. Elle est caractérisée par des feuilles réduites en épines et une grande capacité d'adaptation aux conditions les plus hostiles (Arba *et al.*, 2000). Les formes inerme (*O. ficus-indica*) et épineuse (*O. megacantha*) du figuier de Barbarie ; sont les variétés les plus largement distribuées dans les steppes Algériennes (Arba *et al.*, 2000; Chaouche et Abdul-Hussain, 2008).

Le figuier de Barbarie est une plante arborescente vivace, ligneuse et robuste, de 3 à 6 m de haut (fig.2). Son organisation morphologique en articles aplatis, de forme elliptique ou ovoïdale, couramment appelés cladodes « ou raquettes », constitue sa particularité principale (Feugang *et al.*, 2006; Benattia, 2017). L'appareil racinaire du figuier de Barbarie est superficiel et charnu, en expansion horizontale. Il est capable de coloniser de façon efficace les milieux difficiles, comme il peut développer des racines secondaires charnues en mesure d'atteindre les couches de sol plus profondes en cas d'aridité prononcée. De même, ses racines ont la possibilité d'accueillir des micro-organismes fixateurs d'azote symbiotes pour combler la faiblesse de fertilité pédologique (Nefzaoui et Bensalem, 2002; Mulas et Mulas, 2004).

Les cladodes sont des tiges vertes charnues de forme aplatie, mesurant 30 à 50 cm de long, sur 15 à 30 cm de large et 1.5 à 3 cm d'épaisseur. Elles assurent la fonction chlorophyllienne et sont recouvertes d'une cuticule cireuse (la cutine) qui limite la transpiration de la plante et les protège contre les prédateurs (Scheinvar, 1995; Schweizer, 1999; Stintzing *et al.*, 2005 ;

Feugang et al., 2006; Benattia, 2017). Les cladodes de la base, en vieillissant, finissent par se lignifier pour former un véritable tronc pouvant atteindre 3 à 4 m de haut (**Schweizer, 1999; Sadok et al., 2008).**

Ses feuilles coniques de quelques millimètres de long apparaissant sur les cladodes jeunes, où elles sont rudimentaires, éphémères et caduques. A l'aisselle des feuilles se trouvent les bourgeons auxiliaires typiques des cactacées, appelés les aréoles, au nombre de 150 par cladode. Leurs méristèmes produisent des épines, des glochides, des racines adventives, de nouvelles cladodes ou des fleurs (**Sudzuki, 1995; Neffar, 2012; Boutakiout, 2015; Benattia, 2017).**

Les épines de 1 à 2 cm sont blanchâtres, sclérifiées et solidement implantées. Leur absence ou présence sur les cladodes, définissent la variété inerme ou épineuse (**Neffar, 2012).** Les glochides facilement décrochables sont de fines épines brunâtres de quelques millimètres, présentes similairement dans les deux variétés (**Benattia, 2017).**

Les fleurs d'*Opuntia* sont hermaphrodites et solitaires, larges de 4 à 10 cm, ayant une couleur jaunâtre qui devient rougeâtre à l'approche de la sénescence de la plante. Elles poussent le plus souvent à partir des aréoles marginales situées au sommet des cladodes âgées d'un an, sur la face la plus exposée au soleil. Leur nombre varie selon la position du cladode sur la plante et les facteurs physiologiques, sachant qu'une fleur seulement apparaît dans chaque aréole (**Nerd et al., 1991; Sudzuki, 1995; Neffar, 2012; Reyes-aguero et al., 2006)**

Appelés figues de Barbarie, les fruits sont des grosses baies charnues, ovoïdes ou piriformes, ayant un poids qui varie de 67 à 216 g et offrant un large spectre de couleurs ; blanche, jaune et rouge (**Moffhammer et al., 2006; Neffar, 2012).** La pulpe dont le goût se révèle délicieux et subtil, est toujours juteuse, de couleur jaune-orangé, rouge ou pourpre, parsemée de petites graines pouvant atteindre les 300 graines pour un fruit de 160 g. Cependant, leur peau est pourvue d'épines, comme elle est couverte d'aréoles susceptibles de donner de nouvelles fleurs ou des racines (**Schweizer, 1999; Piga, 2004; Feugang et al., 2006 ; Reyes-aguero et al., 2006).**

Dans les climats tempérés, la floraison a lieu en avril-mai et les fruits sont cueillis fin juillet à septembre, dès qu'ils deviennent un peu mous. Cette plante peut donner des fruits deux fois par an dans certaines contrées arides et chaudes (**Schweizer, 1999; Boutakiout, 2015).**



Tige ligneuse



Cladodes



Fleur



Bourgeon floral



Fruits



Graines

Figure 2: Les différentes parties du Figuier de Barbarie (Benattia, 2017; Inglese, 2018; Cliché Moussaoui, 2019)

Les graines sont indigestes, réniformes ou lenticulaires et caractérisées par leur dureté. Le pourcentage et le nombre de graines par fruit varie en fonction de plusieurs facteurs dont la variété, la physiologie et l'environnement de culture (**Habibi, 2004 ; Reyes-Aguero et al., 2005**).

I.3. Utilisations des différentes parties du figuier de Barbarie

Le figuier de Barbarie est l'exemple typique d'espèce parfaitement convenable pour la mise en valeur des zones arides et semi-arides. Sa culture est peu exigeante en investissements et le revenu qu'elle peut générer est d'une importance économique capitale (**Benattia, 2017**). En plus, tant comme culture extensive qu'à l'état spontané et depuis ses racines jusqu'à ses épines, le nopal appartient aux plantes les plus utilisées dans différents domaines économiques (figs.3 et 4) (**Benattia, 2017**).

I.3.1. Alimentation humaine

La consommation des fruits à l'état frais demeure sans aucun doute l'utilisation principale du figuier de Barbarie. Ceci a incité à améliorer les qualités organoleptiques des fruits, d'éliminer les glochides gênantes, de réduire le nombre des graines et de perfectionner les techniques de conservation frigorifique (**Saenz, 2000; Mulas et Mulas, 2004**). En plus, il est possible de consommer la figue de Barbarie bouillie dans l'eau, séchée, congelée ou fermentée, ou même après sa transformation technologique en produits ayant une bonne qualité sensorielle et une stabilité microbiologique : jus, nectar, conserve, miel, marmelade, boissons alcoolisées (Colanche, Téquila) et confiture.... (**Pimienta-Barrios, 1993; Saenz, 2000; Espirad, 2002; Habibi, 2004; Arba, 2009, Boutakiout, 2015**)

Par ailleurs, les jeunes raquettes (nopals ou nopalitos) tendres et nutritivement similaires à la laitue et aux épinards, sont consommées en tant que légume à l'état frais dans les salades ou cuites comme ingrédients dans la confection d'autres préparations alimentaires (**Hoffmann, 1995; Saenz, 2000; Arba, 2009**). Là aussi, la dérivation des nopals en sous-produits est possible où elle aboutit à l'obtention de confiture, de cornichon, des frites et des confits, de conserves au vinaigre ou en saumure (**Stintzing et Carle, 2005; Arba, 2009**).

Les deux colorants extraits à partir de la figue de Barbarie sont le rouge carmin et la bétalaïne (**Boutakiout, 2015**). Le rouge carmin est une teinte (E-120) produite par l'élevage des cochenilles sur l'*Opuntia*. Ses qualités naturelles et biochimiques sont très recherchées par l'industrie alimentaire (**Arba, 2009**). Les bétalaïnes sont les pigments cachés derrière la coloration des fruits de cactus rouge ou pourpre. Ces colorants naturels ont une bonne stabilité

dans une large gamme de pH (4 à 7) et une odeur agréable, leur conférant la possibilité d'emploi pour la coloration des denrées alimentaires à acidité faible, et ceux ne requièrent pas de traitement thermique tels que les glaces alimentaires et les desserts (**Fernandez-Lopez et al., 2002; Castellar et al., 2003; Boutakiout, 2015**).

L'huile comestible des graines du fruit présente un haut degré d'insaturation, avec un taux important d'acide linoléique, d'acide palmitique et d'acide oléique (**Sepúlveda et Sáenz, 1988; Ramadan et Mörsel, 2003**).

I.3.2. Alimentation animale

La culture d'*Opuntia* suscite également un grand intérêt dans la production de fourrage, qui constitue sa deuxième grande utilisation, notamment en milieux aride et semi-aride où sa présence est strictement nécessaire en certaines périodes de l'année, puisqu'elle est le seul stock alimentaire disponible pour le bétail (**Habibi, 2004; Mulas et Mulas, 2004**).

L'*O. ficus indica* est la plus productive des zones arides avec 1.37 kg/an/m² par rapport à la moyenne des autres espèces (0.71 kg/m²/an), sans oublier sa valeur énergétique proche de celle de la luzerne et sa richesse en eau et en fibre très appréciées par le bétail. Leur consommation permet également d'améliorer la saveur du lait et la couleur du beurre (**Arba, 2009; Benattia, 2017**).

En outre, le cycle de floraison abondante, qui peut s'étendre de 3 à 6 mois selon la région et la variété, rend le figuier de Barbarie une source mellifère importante qui attire les abeilles en masses par les grandes fleurs jaunes, par le pollen abondant et le nectar (**Neffar, 2012; Arba, 2009**).

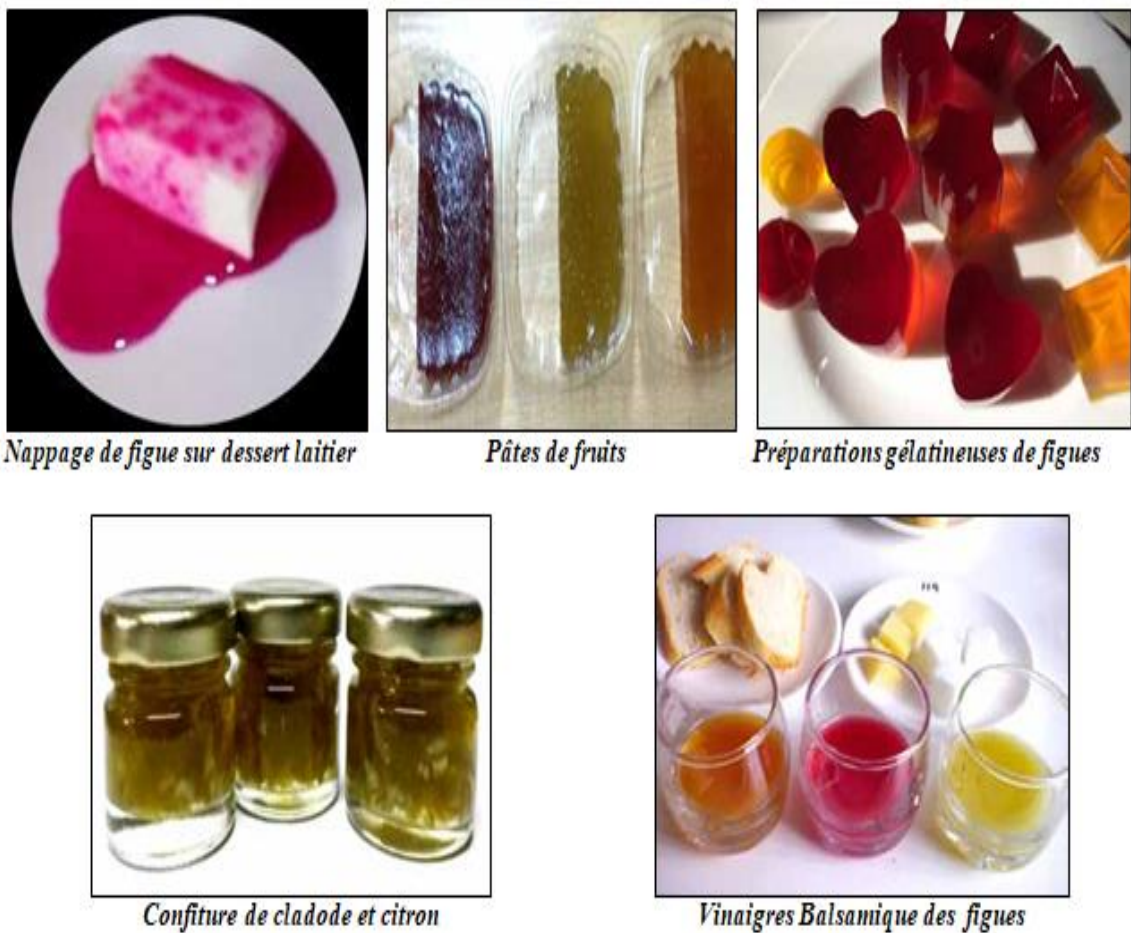
I.3.3. Utilisation thérapeutique

La recherche moderne a non seulement confirmé les vertus du nopal, que la médecine traditionnelle seule reconnaissait jusqu'à nos jours, mais découvre chaque année de nouvelles propriétés. L'*Opuntia* était préconisé anciennement dans le traitement des abcès, des cors, des durillons, des furoncles et de toutes les inflammations digestives et cutanées (**Schweizer, 1999**).

On pense que les fruits arrêtent les coliques et les diarrhées alors que les organes végétatifs ont une fonction antipyrétique, anti-inflammatoire, analgésique et antispasmodique. Par ailleurs, les fleurs séchées sont utilisées pour la préparation de tisanes diurétiques qui soulagent les maux de reins (**Barbera, 1991; Mulas, 1992; Araba et al., 2000**).



Figure 3: Emballage des figes de Barbarie et des nopals destinés à la consommation humaine (Inglese, 2018)



Nappage de figue sur dessert laitier

Pâtes de fruits

Préparations gélatineuses de figes

Confiture de cladode et citron

Vinaigres Balsamique des figes

Figure 4: Images de certains produits issus du figuier de Barbarie (Inglese, 2018).

Les jeunes raquettes ont une action hypoglycémique, due à l'adsorption du glucose des aliments économisant par conséquent la synthèse d'insuline, ainsi qu'une action hypocholestérolémique basée sur la stimulation de la sécrétion biliaire et de l'utilisation du cholestérol présent dans le sang par adsorption des sels biliaires (Fernandez *et al.*, 1990; Mulas, 1992; Arba, 2009). Au-delà, les raquettes hachées ont servi de cataplasmes dans le pansement des foulures, des entorses et dans la réduction des fractures (Schweizer, 1999).

Selon des études cliniques récentes, cette même espèce élimine l'excès d'ammoniaque accumulé dans certains organes, combat avec succès les radicaux libres et neutralise les toxines qui affaiblissent le système immunitaire. Des propriétés anxiolytiques et des effets galactogènes et fortifiants chez les femmes allaitant leurs enfants ont été, également, attribuées à cette espèce (Schweizer, 1999). Récemment, les technologies modernes visent à élaborer des alicaments sous forme de gélules ou capsules à partir des différentes parties du figuier de Barbarie (Boutakiout, 2015).

Dans le domaine cosmétique, des produits de soin comme les crèmes dermiques et les onguents, le savon, les shampoings, les assouplissants des cheveux et les laits hydratants, ont été issus de mucilage des cladodes pour le soin des mains et des visages (Boutakiout, 2015; Araba *et al.*, 2000; Bhira, 2012). De plus, l'huile de pépins de figes de Barbarie est exceptionnellement riche en vitamine E et en stérols, et a une aptitude antiride hors du commun, exploitée dans la fabrication des crèmes dermiques anti-âge. Cette huile cicatrisante redonne le tonus et la fermeté à la peau, prévient son vieillissement et la protège contre les radicaux libres et les agressions du temps (Bhira, 2012; Boutakiout, 2015)

I.4. Focus sur les cladodes du figuier de Barbarie

I.4.1. Anatomie et histologie des cladodes

Au cours de l'évolution, *O. ficus-indica* a développé des caractéristiques morphologiques, anatomiques et physiologiques qui lui ont permis de faire face aux conditions défavorables rencontrées dans les environnements arides (Nobel, 1994, 1995; Ventura-Aguilar *et al.*, 2017). Anatomiquement, le cladode en coupe transversale est une eustèle, formée par : la peau, le cortex, les tissus vasculaires ; disposés en cercle et composés de faisceaux collatéraux séparés par du tissu parenchymateux, et la moelle qui est le tissu succulent majeur (fig.5) (Inglese, 2018).

I.4.1. 1. La peau

La peau est composée d'une couche épidermique continue de cellules plates, fines, en forme de pavé, et de 6 à 7 couches de cellules hypodermiques très résistantes, avec une épaisse paroi cellulaire ressemblant à du collenchyme lamellaire (Inglese, 2018). Ces deux couches forment une barrière efficace pour éviter les dommages physiques et maintenir l'intégrité mécanique. L'épiderme d'une épaisseur de 117.33 à 120 μm , constitue la couche protectrice la plus périphérique du corps du cactus qui comporte des stomates, régule le mouvement du CO_2 entrant et de l' O_2 sortant et retient l'eau dans le corps de la plante, alors que l'hypoderme joue le rôle de première ligne de défense contre les champignons, les bactéries et le broutage par de petits organismes (Mauseth, 1984; Ventura-Aguilar *et al.*, 2017; Inglese, 2018).

La paroi externe de l'épiderme est imprégnée et couverte d'une couche relativement épaisse (8-20 μm) d'une substance cireuse résistante à l'eau, appelée cutine. Chimiquement, cette couche donnant aux cladodes leur apparence glauque, est un mélange d'acides gras qui se polymérisent spontanément en présence d'oxygène, pour se révéler, sous microscope électronique, en agrégats de plaques semi-verticales et écailles semi-verticales (Metcalf et Chalk, 1979; Mauseth, 1984).

Cette cire rugueuse autour des cellules épidermiques retient la vapeur d'eau dans la plante et repousse l'eau de surface comme elle reflète les radiations solaires, réduisant ainsi la température de la tige (Gibson et Nobel, 1986). En outre, la surface pliée de l'épiderme, au lieu d'une surface lisse, affecte la force, la flexibilité et la capacité du rameau à se gonfler sans se déchirer. Ceci est expliqué par le fait que la surface plissée assure, lorsque l'eau est absorbée par les cladodes, un écartement des bases des côtes et une augmentation du volume sans requérir un accroissement de superficie (Mauseth, 2000; Mauseth, 2006).

Contrairement aux plantes à graines, l'épiderme des Cactaceae persiste durant des décennies comme un tissu vivant et est finalement remplacée par l'écorce « le périderme », via le processus de vieillissement. La formation du périderme est également possible par les tissus du cortex en cas de rupture de la peau par blessures (Mauseth, 2006)

Par ailleurs, l'épiderme contient des cristaux d'oxalates de calcium nommés druses. En dépit de leur passivité physiologique et osmotique, ces cristaux peuvent devenir un moyen de défense en rendant plus difficile la mastication de la peau par les insectes (Ventura-Aguilar *et al.*, 2017; Inglese, 2018).

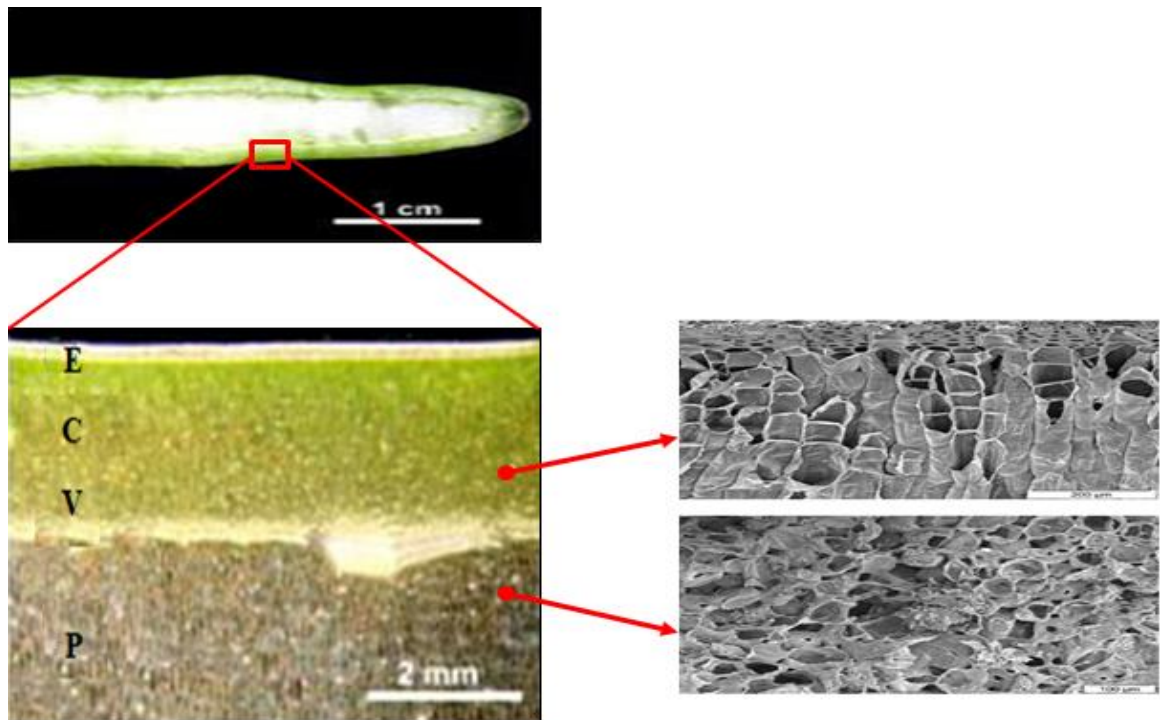


Figure 5: Morphologie du cladodes de figuier de Barbarie: (E) épiderme, (C) chlorenchyme, (V) vaisseaux conducteurs et (P) parenchyme (Ginestra *et al.*, 2009; Malainine *et al.*, 2001).

I.4.1. 2. Le cortex

L'*Opuntia* a un épais cortex palissadique chlorophyllien nommé chlorenchyme, recouvrant un cortex interne moins ou non chlorophyllien appelé parenchyme (Mauseth, 2005). Le chlorenchyme d'*Opuntia* est disposé en longues rangées radiales de cellules parenchymateuses chlorophylliennes et succulentes, séparant l'hypoderme et l'anneau de faisceaux vasculaires. C'est la partie verte qui contient les chloroplastes et assure principalement la fonction de photosynthèse (Inglese, 2018).

Le parenchyme ou "tissu blanc" est formé de cellules parenchymateuses sphéroïdales homogènes avec de petits espaces intercellulaires, dont les chloroplastes sont substitués par d'autres organites à l'exemple des amyloplastes. En plus de son action essentielle de stockage d'eau, cette partie est l'usine chimique qui produit les hormones, alcaloïdes, composés phénoliques et autres produits formés par le métabolisme de la plante (Mauseth, 1984; Saveja et Mauseth, 1991; Ventura-Aguilar *et al.*, 2017; Inglese, 2018).

Les deux parties ; verte et blanche, contiennent des idioblastes, remplis avec du mucilage ou de cristaux plus petits que ceux des cellules épidermiques (Mauseth, 1984 ; Saveja et Mauseth, 1991).

I.4.1. 3. Les tissus vasculaires

Sous le cortex, toutes les tiges d'*Opuntia*, même les cladodes les plus plats, ont un unique anneau de faisceaux vasculaires collatéraux avec un tissu mou entre eux (eustèle), correspondant au cambium fasciculaire ou rayons médullaires. Ces tissus vasculaires sont connectés au tissu méristématique des aréoles et forment un réseau élaboré de faisceaux accessoires très finement fenestrés (Bailey, 1961; Gibson, 1976; Mauseth, 2004; Inglese, 2018).

Le xylème au nombre de 4 à 9 vaisseaux par mm² est simple et ses éléments de vaisseaux de 75 µm de large, sont caractérisés par des épaississements hélicoïdaux et annulaires, avec des perforations scalariformes ou réticulées dans la paroi secondaire (Hamilton, 1970; Jiménez-Sierra et Reyes, 2000; Pimienta-Barrios *et al.*, 2003). Cependant, les cellules mucilagineuses et les grains d'amidon sphéroïdaux sont abondants autour des faisceaux vasculaires (Inglese, 2018).

I.4.1.4. La moelle

La moelle d'*O. ficus indica* est faite de larges cellules parenchymateuses sphéroïdales, à fines parois cellulaires, similaires à celles du cortex intérieur. Ses cellules les plus proches des faisceaux vasculaires contiennent souvent de nombreux grains sphéroïdaux d'amidon ou du mucilage et quelques petites druses (Inglese, 2018).

I.4.1.5. Les stomates

Les stomates abondants et régulièrement distribués chez les autres Cactaceae, sont aléatoirement distribués et peu nombreux (15-35 par mm²) chez *O. ficus-indica* (Mauseth, 1984; Sajeva et Mauseth, 1991).

Les cellules de garde de 40 µm sont entourées par 3-4 rangées de cellules subsidiaires et encastrées de façon à ce que le pore soit caché de la surface de la tige (fig.6). Le canal substomatal, proéminent à travers le tissu hypodermique sclérenchymateux, se relie à la chambre sous-stomatique située dans le chlorenchyme, ce qui forme un passage pour les échanges gazeux entre l'atmosphère et le tissu photosynthétique (Inglese, 2018).

I.4.1. 6. Les aréoles

Les aréoles sont ovales et distribuées en une formation hélicoïdale à 2 mm sous la surface de la peau, elles se forment à partir du court méristème apical à la base d'un mamelon proéminent surnommée podarium, qui se perd lorsque la tige vieillit (fig.7). Ce podarium porte

une petite structure subulée à vie courte, correspond à une feuille, qui flétrit et tombe rapidement (Mauseth, 1984). Quand le cladode est jeune, les aréoles émergent de nouveaux cladodes, des épines au lieu de feuilles, des fleurs ou racines depuis leurs tissus méristématiques (Sudzuki, 1995).

I.4.1.7. Cellules mucilagineuses

Les cladodes d'*Opuntia* ont de larges canaux doublés avec un épithélium pluristratifié, remplis par des cellules mucilagineuses non-attachées par la lamelle moyenne, flottant librement dans le mucilage extracellulaire. Les cellules mucilagineuses sont présentes dans tous les types de tissus : hypodermique, cortical, vasculaire et moelle. Elles produisent des petites vésicules de mucilage dont le contenu est déposé en dehors du cytoplasme quand sa quantité augmente. Par la suite, la cellule productrice meurt et tous ses organites se décomposent, laissant seulement du mucilage (fig.6). Les conduits mucilagineux sont formés par une dégradation lysogénique des parois séparant les cellules mucilagineuses (Freeman, 1969; Gibson et Nobel, 1986; Mauseth, 1980, 2005).

Le mucilage formé par des glucides indigestibles, constitue 14 % de la matière sèche de cladode, il est très glissant, complexe et aide à retenir l'eau à l'intérieur de la plante (Gibson et Nobel, 1986).

I.4.1.8. Epines et glochides

La présence d'épines chez *O. ficus-indica*, est la caractéristique particulière des aréoles et il est possible d'en distinguer deux types : épines et aiguillons (glochides), tous les deux considérés en tant qu'équivalents morphologiques des feuilles, à un nombre et une durée dépendant de leur type (fig.7) (Boke, 1944; Robinson, 1974; Anderson, 2001).

Pour ce cactus, un nombre variable d'épines blanches se développe à partir des aréoles, mais il y a souvent une ou deux longues épines centrales (1 à 3 cm), plus épaisses, composées par des cellules allongées à paroi lignifiée ; chacune est accompagnée par deux épines latérales plus courtes (Gibson et Nobel, 1986; Anderson, 2001)

Généralement, ces épines sont présentes au premier stade de croissance du cladode et la plupart tombent avec l'augmentation de la température, persistant parfois seulement à la base des cladodes pour une longue période. Les épines sont formées en séries et on peut noter que pendant que leur pointe se durcit, le méristème basal continue de s'allonger (Buxbaum, 1950; Mauseth, 1984). Elles représentent 8.4% du poids total du cladode, avec une constitution majoritairement

polysaccharidique (96%), divisée en cellulose (47.9%) et hémicellulose (48.4%). le reste comporte la lignine, les cendres, la graisse et de très petites quantités de cires (**Malainine et al., 2003**).

De plus, les épines ont une surface rugueuse qui résulte de leur recouvrement par une cuticule de protection contre la dessiccation. Les couches hydrophobes des épines sont empilées et décalées de manière circulaire en raison de la croissance de la colonne vertébrale à partir du cladode, ce qui conduit à une section mince à l'extrémité et à une section plus grande près du cladode (**Malainine et al., 2003**).

Ainsi, les cultivars sans épines se caractérisent par d'abondants dépôts de cire épicuticulaire rugueuse et cristalloïde et par des épines caduques et fissurées, tandis que les cladodes épineux présentaient une cire lisse amorphe et des épines fortes et persistantes (**Salem-Fnayou et al., 2014**).

Par leur présence, les épines évitent la prédation par les herbivores, réfléchissent la lumière, ombrent la tige, et permettent donc la réduction de la perte en eau ainsi que la condensation du brouillard (**Anderson, 2001; Jiménez-Sierra et Reyes, 2000; Pimienta-Barrios et al., 2003**).

Les glochides du figuier de Barbarie apparaissent simultanément aux épines. Ils sont minuscules, courts et multicellulaires, en plus d'être pointues, barbelées et décidues. Ils confèrent leur couleur brune aux aréoles (**Anderson, 2001; Inglese, 2018**). Ils sont composés de microfibrilles parallèles de cellulose cristalline (à 100%) exempte d'hémicellulose, avec 0.4 mm de longueur et 6 à 10 μm en diamètre, ancrées dans un gel solide, tissé et serré d'arabinose (**Pritchard et Hall, 1976; Waldron et al., 1996; Malainine et al., 2003; Vignon et al., 2004**). Or, la surface des glochides est lisse, mais dure et sclérifiée; puisque couverte d'écailles barbelées (**Buxbaum, 1950**).

Les glochides s'arrangent en 4-6 touffes serrées attachées aux cavités des aréoles, incluant chacune 7-12 aiguillons. Quoique, le développement d'un phellogène sur la région corticale extérieure autour de la base de chaque touffe, rend ces glochides facilement retirables quand ils sont touchés ou soufflés par le vent. Leur fonction précise reste incertaine, mais ils peuvent condenser l'eau de l'air (**Buxbaum, 1950**).

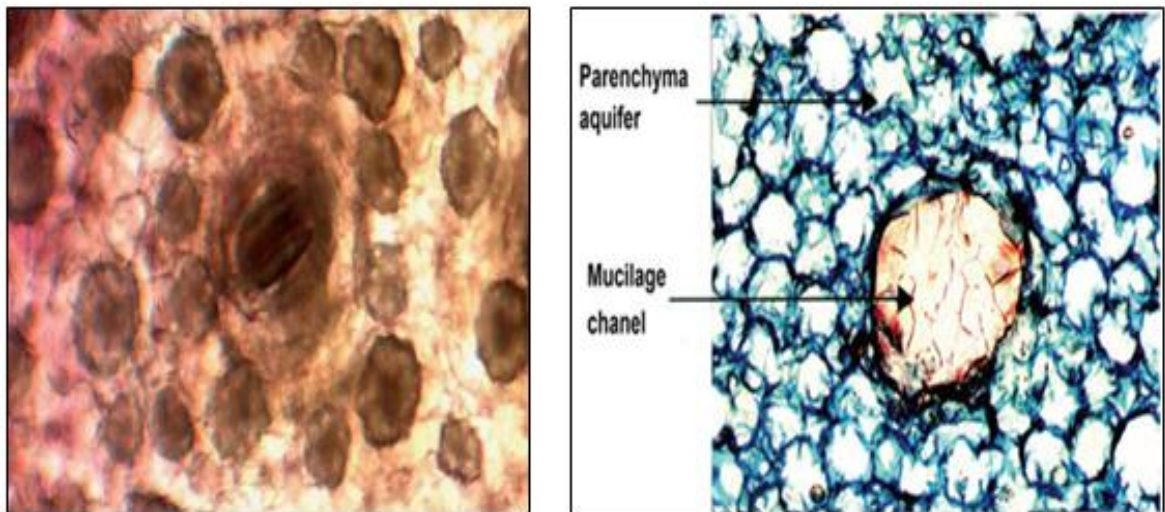


Figure 6: Morphologie d'une stomate entouré par des druses (à gauche) et d'un canal de mucilage (à droite) (Olvera et Romero, 2006; Inglese, 2018).

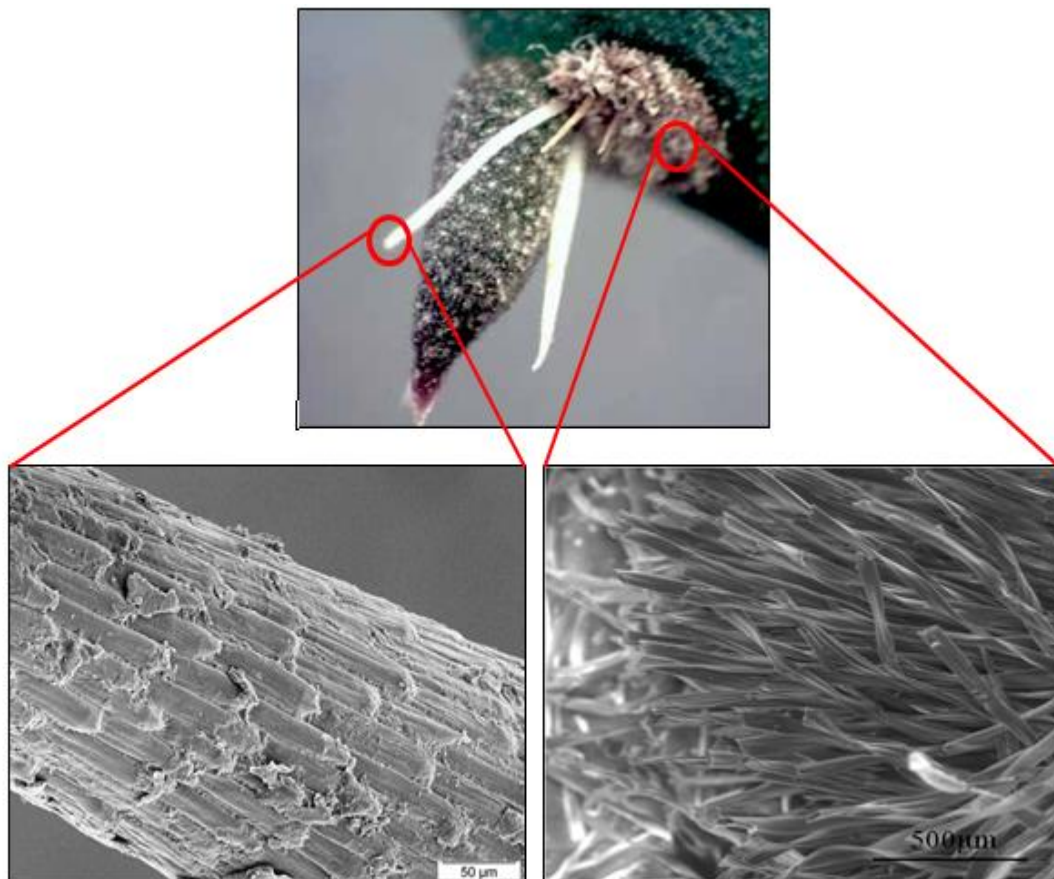


Figure 7: Morphologie d'une aréole de cladode présentant deux épines, une feuille éphémère et plusieurs glochides brunâtres (Malainine *et al.*, 2001; Salem-Fnayou *et al.*, 2014; Inglese, 2018)

I.4.2. Composition chimique des cladodes

Les nopals sont connus par leur richesse en composés bio-fonctionnels aux propriétés nutritionnelles et curatives souhaitables ; à savoir les fibres, le calcium et la vitamine C, les composés phénoliques, les hydrocolloïdes, la chlorophylle et les caroténoïdes. Leur valeur nutritive est similaire alors à de nombreux légumes à feuilles tels la laitue et les épinards (tableau 1) (Galati *et al.*, 2003; Sáenz *et al.*, 2006).

Cette composition chimique ne devrait pas être prise comme une valeur absolue, puisqu'elle varie en fonction des facteurs climato-édaphiques du site de culture et de la saison, en plus des différences attribuées aux espèces, aux variétés et à l'âge de la plante (Stintzing et Carle, 2005; El Kharrassi, 2015)

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

Composant	Taux (g/100g MS)	Taux (g/100g PF)
Eau	-	88-95
Glucides	64-71	3-7
Cendres	19-23	1-2
Fibres	18	1-2
Protéines	4-10	0.5-1
Lipides	1-4	0.2

MS: matière sèche, PF: poids frais

I.4.2.1. Macrocomposition

I.4.2.1.1. L'eau et les minéraux

La teneur en eau varie entre 80 à 95%, elle donne aux cladodes une valeur alimentaire en étant pauvre en calories (27 kcal/100g) (Murillo-Amador *et al.*, 2002, Bhira, 2012).

Dans la raquette, les minéraux peuvent toucher un seuil de 23% MS, où la prédominance est pour le calcium et le potassium, avec des quantités allant jusqu'à 1.79 et 5.52 g/100g MS, respectivement (Feugang *et al.*, 2006; Ayadi *et al.*, 2009). Le zinc et le magnésium existent à des taux de 15.2 ± 1.2 et 78.7 ± 0.8 mg/100g MS (Bakari *et al.*, 2017). En ce qui concerne les anions, le sulfate, le chlorure, le nitrate et l'oxalate sont les plus représentés (Missaoui *et al.*, 2020)

L'oscillation du taux de minéraux dans les cladodes est liée aux conditions de croissance telles que la salinité et les paramètres physico-chimiques du sol, le stade de maturité et la présence d'épines (Ayadi *et al.*, 2009; Contreras-Padilla *et al.*, 2012).

I.4.2.1.2. Glucides

Les glucides sont les macromolécules les plus abondantes dans les cladodes d'*Opuntia*, ils sont compris entre 64 et 80.9 % par rapport au poids sec. Cependant, ce taux est proportionnel aux variations agronomiques et environnementales ainsi qu'à l'âge des cladodes, car les jeunes sont les plus riches en glucides (tableau 2) (Ginestra *et al.*, 2009; Guevara-Figueroa *et al.*, 2010).

Les cladodes de cactus contiennent de grandes quantités de fibres (jusqu'à 51.6% MS), y compris du mucilage, de pectine, de la lignine, de la cellulose et de l'hémicellulose (Ayadi *et al.*, 2009; Guevara-Figueroa *et al.*, 2010). La teneur moyenne de la cellulose, d'hémicellulose et de la lignine dans les cladodes sèches est, respectivement de 11, 8 et 3.9 (Thlija, 1987).

L'amidon fluctue en fonction des saisons pour atteindre une valeur moyenne de 85 à 171 mg/g de poids sec (Retamal *et al.*, 1987). Le glucose et l'acide galacturonique sont les principaux sucres des cladodes d'*Opuntia* (Belhadj Slimen *et al.*, 2016).

I.4.2.1.3. Protéines

La teneur en protéines totales des cladodes varient de 4 à 10 % en fonction de plusieurs déterminants comme la phase de croissance (Astello-García *et al.*, 2015; Belhadj Slimen *et al.*, 2016). Dans les cladodes du figuier de Barbarie, il existe 18 acides aminés, auxquels la glutamine, la leucine, la lysine, la valine, l'arginine, la phénylalanine et l'isoleucine sont les mieux représentés (tableau 2) (Brückner *et al.*, 2003; El-Mostafa *et al.*, 2014).

I.4.2.1.4. Lipides

Astello-García *et al.*, (2015) rapportent un pourcentage de 0.68 à 1.14 pour la matière grasse des cladodes. Les analyses chromatographiques ont démontré que l'acide linoléique (C18: 2), l'acide linoléique (C18: 3), l'acide palmitique (C16: 0) ainsi que l'acide oléique (C18: 1), contribuent à plus de 90% des lipides totaux extraits à partir des cladodes de ce cactus. En plus, les acides linoléique et linoléique constituent les principaux acides gras polyinsaturés (67.7%) (tableau 2) (Abidi *et al.*, 2009). L'étude de la fraction stérol a démontré la présence de 5% de cholestérol, 8% du méthylcholestérol, ainsi que 87% de sitostérol (Stintzing et Carle, 2005).

I.4.2.1.5. Acides organiques

L'acidité des nopals varie pendant la journée du fait du métabolisme acide crassulacéen (CAM) (Cantwell *et al.*, 1992). Ceci est expliqué par l'effet du rythme diurne de ce métabolisme particulier, qui fait varier les teneurs des différents acides contenus dans les cladodes, dont l'acide malique est le plus fortement présent (Stintzing et Carle, 2005; Kader, 2002; Salem *et al.*, 2005).

Les acides citrique, oxalique et malonique se trouvent en deuxième rang en termes de présence, mais il faut signaler que ce dernier est absent dans les cladodes âgées (tableau 2). L'acide tartrique et succinique ont été trouvés seulement à l'état de traces (Teles *et al.*, 1984). Les acides phorbique et piscidique rares dans la nature, sont présents exceptionnellement dans les plantes (CAM). Avec l'âge, l'acide piscidique augmente en quantité, alors que l'acide phorbique est réduit de moitié de sa valeur initiale (Teles *et al.*, 1984).

I.4.2.2. Microcomposition

I.4.2.2. 1. Les Vitamines

Les cladodes d'*Opuntia*, notamment ceux du stade jeune, sont une bonne source de vitamines (Stintzing et Carle, 2005). La teneur totale des vitamines selon un ordre décroissant de présence dans 100 g de matière fraîche, s'élève à 22mg pour la vitamine A et la vitamine C (acide ascorbique et déhydroascorbique), 0.46, 0.14 et 0.6 mg pour la riboflavine (B₂), la niacine (B₃) et la thiamine (B₁), présents uniquement dans la raquette ; alors qu'elle n'excède pas 11.3 à 53.5 µg pour le β-carotène (Stintzing et Carle, 2005; Feugang *et al.*, 2006; Ventura-Aguilar *et al.*, 2017).

I.4.2.2. 2. Les caroténoïdes et les chlorophylles

Le profil des caroténoïdes se partage en α-cryptoxanthine (20%), β-carotène (36%) et en lutéine (44%), sachant que le tout englobe une somme de 229 µg/g MS, une valeur qui peut augmenter avec un traitement thermique (Jaramillo-Flores *et al.*, 2003). La Chlorophylle totale dans les cladodes est estimée à 12.5 mg/100g PF, répartie en 9.5 mg de chlorophylle (a) et 3mg de chlorophylle (b) (Guevara *et al.*, 2001).

I.4.2.2.3. Les substances phénoliques

La teneur en phénol diffère selon le type de tissu, le stade de développement et la manipulation post-récolte. Le chlorenchyme contient plus que le parenchyme, les jeunes nopals

dépassent les cladodes âgés et ceux cuits sont moins abondants en polyphénols que les crus (Ventura-Aguilar *et al.*, 2017).

Les travaux de **Rodrigues-Felix (2002)**, soulignent que les polyphénols totaux représentent entre 8 à 9 mg/100g PF dans les raquettes mexicaines. L'acide ferulique, l'acide p-Coumarique, l'acide Hydroxybenzoïque, l'acide caféïque, l'acide salicylique et l'acide gallique, sont parmi les acides phénoliques détectés dans cette partie végétale. À propos des flavonoïdes, on peut citer l'isorhamnetine, le kaempférol, la quercétine et l'iso-quercitrine, la rutine, la catéchine et l'épicatéchine, la nicotiflorine et la narcissine (**Guevara-Figueroa *et al.*, 2010**; **Ventura-Aguilar *et al.*, 2017**).

I.4.2.2.4. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés biologiques organocycliques azotés, appartenant généralement à la même famille de plantes, car les voies de biosynthèse sont souvent similaires (**Yubin *et al.*, 2014**). Malgré la forte toxicité d'un bon nombre de ces composés, ils ont une activité pharmacologique significative expliquant leur large utilisation en phytothérapie ou en tant que produits pharmaceutiques (**Petruczynik, 2012**).

La mescaline, l'Opuntine B et l'asterredione ont été rapportés par **Buckingham *et al.*, (2010)** comme présents dans certaines espèces d'*Opuntia*.

I.4.2.2.5. Les bétalaïnes

Les bétalaïnes sont des pigments naturels hydrosolubles présents dans un nombre limité de familles de plantes, appartenant à l'ordre des caryophyllales comme le genre *Opuntia* (**Gandía-Herrero et García-Carmona, 2013**; **Betancourt *et al.*, 2017**). Ces biocomposés ont l'acide bétalamique comme unité structurelle basique, qui forme la classe des bétaxanthines jaunes-oranges par condensation avec différents acides aminés ou groupes amines libres, alors qu'il donne la classe des bétacyanines rouges-violettes après conjugaison avec des dérivés d'indoline (**Gandía-Herrero et GarcíaCarmona, 2013**).

Belhadj Slimen *et al.* (2016), citent que plusieurs études qui ont affirmé la présence d'une large gamme de bétalaïnes dans les différentes parties d'*Opuntia*, à l'exemple de l'indicaxanthine, la néobétanine, la bétanine, l'isobétanine, la bétanidine, la Gomphrénine I et la Vulgaxanthine I et II.

Tableau 2: Tableau récapitulatif de la composition des cladodes de *O. ficus indica* en monosaccharides non cellulosiques, en acides organiques à deux moments de la récolte, en minéraux, en acides aminés et en acides gras (Stintzing et Carle, 2005; Abidi *et al.*, 2009; Ginestra *et al.*, 2009; El Kharrassi, 2015).

Glucide	Teneur (µg/mg)	Acide organique	Teneur (mg/100g PF)		Minéral	Teneur (mg/100g MS)	Minéral	Teneur (mg/100g MS)
			6h (matin)	18h (après-midi)				
Rhamnose	7.13 ± 1.28	Acide oxalique	35	35	Calcium	5.64 - 17.95	Magnésium	8.80
Fructose	0.74 ± 0.11	Acide malique	985	95	Calcium oxalate	4.3 - 11.5	Potassium	2.35–55.20
Arabinose	39.64 ± 1.96	Acide citrique	178	31	Sodium	0.3 - 0.4	Phosphore	0.15–2.59
Xylose	18.64 ± 0.84	Acide malonique	36	Traces	Fer	0.09		
Mannose	13.64 ± 0.81	Acide succinique	Traces	Traces	Zinc	0.08		
Galactose	33.69 ± 2.89	Acide tartrique	Traces	Traces	Manganèse	0.19 - 0.29		
Glucose	153.15 ± 6.54				Cuivre	----		

Acide aminé	Teneur (mg/100g MS)	Acide aminé	Teneur (mg/100g MS)	Acide Gras	Teneur (mg/100g MS)
Alanine	4.75	Sérine	8.46	C12 :0	1.33
Arginine	6.63	Thréonine	1.53	C14 :0	1.96
Asparagine	Trace	Tyrosine	3.09	C16 :0	13.87
Acide aspartique	10.42	Tryptophane	Trace	C16 :1	0.24
Acide glutamique	21.68	Valine	6.02	C18 :0	3.33
Glutamine	Trace	A. α-aminobutyrique	Trace	C18 :1	11.16
Cystéine	0.37	Carnosine	Trace	C18 :2	34.87
Histidine	3.11	Citrulline	Trace	C18 :3	33.23
Isoleucine	6.20	Ornithine	Trace	C20 :0	----
Leucine	9.94	Proline	Trace	C22 :0	----
Lysine	6.79	Taurine	Trace	C22 :1	----
Méthionine	0.70	Glycine	5.06	C24 :0	----
Phénylalanine	5.25				

Chapitre II
Matériels et méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal : préparation du cladode à l'analyse

Les jeunes cladodes de la variété inerme d'*O. ficus indica*, âgés de moins de 3 mois et reconnus par une longueur de 12-20 cm et une largeur comprise entre 6-9 cm, ont été prélevés aléatoirement à partir de plusieurs sujets spontanés de la région de Tissemsilt le mois de novembre 2017. Les échantillons immédiatement placés dans la glace à l'abri de la lumière et de l'humidité, sont transportés au laboratoire où ils seront nettoyés et débarrassés de leurs épines, désinfectés à l'hypochlorite de sodium 10%, puis lavés à l'eau distillée avant d'être séchés et congelés jusqu'à leur utilisation.

Les jeunes raquettes sont préparées de manières différentes suivant la spécificité des analyses visées. Les jeunes cladodes sont découpés en morceaux afin d'être fraîchement utilisés en l'état originare ou sous forme de purée centrifugée à 15000 tr/min à 4 °C pendant 20 min pour récupérer et utiliser le surnageant frais.

Cependant, une partie des cladodes a été coupée en fines tranches qui sont séchées à 40 °C/7 jours puis broyées à 1000 tr/min dans un broyeur couplé à un tamis de mailles de 0.85 mm. La poudre fine obtenue avec une granulométrie homogène a été stockée dans un pot étanche à l'air et protégée de la lumière.

II.2. Les souches bactériennes et fongiques utilisées

Les souches bactériennes

La souche bénéfique *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 provient de la collection de notre laboratoire LMBAFS (Laboratoire de Microorganismes Bénéfiques, Aliments Fonctionnels et Santé, Université de Mostaganem-Algérie). Les souches pathogènes *Staphylococcus aureus* (ATCC 33862), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659) et *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), ainsi que la souche commensale *Escherichia coli* (ATCC 25922), appartiennent la collection américaine « American Type Culture Collection »

La souche fongique

Il s'agit de la levure *Candida albicans* ATCC (10231) qui est également issue de la collection américaine des souches ATCC.

II.3. Analyse physico-chimique du cladode

II.3.1. Humidité

La teneur en eau est déterminée par dessiccation de 2g d'échantillon dans un creuset placé dans l'étuve à 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant (AFNOR NF V03-40). La teneur en eau se calcule par la formule suivante :

$$H\% = \frac{M1 - M2}{PE} \cdot 100$$

Dont : **H%** : Humidité, **M1** : Poids de la capsule + échantillon avant dessiccation, **M2** : Poids de la capsule + échantillon après dessiccation, **PE** : La prise d'essai.

La matière sèche (MS), quant à elle, présente ce que l'on obtient lorsqu'on retire l'eau d'un produit :

$$MS\% = 100\% - H\%$$

II.3.2. Les cendres

2 g d'échantillon placés dans des capsules en porcelaine, sont incinérées dans un four à moufle à 550 °C pendant 5 h jusqu'à l'obtention d'une couleur grise claire ou blanchâtre. On procède ensuite à la pesée des capsules refroidies dans un dessiccateur pour obtenir le poids final (AOAC, 2000). Le taux de cendre est calculé par la formule suivante :

$$TC(\%) = \frac{P2 - P1}{P0} \cdot 100$$

Avec : **TC** : Taux de cendre (%), **P₀** : Poids de la prise d'essai (g), **P₁** : Poids du creuset vide (g), **P₂** : Poids de l'échantillon après incinération (g).

II.3.3. pH

La mesure du pH a été réalisée en plongeant l'électrode du pH-mètre dans une solution de cladodes frais à 10% (P/V) préparée en laissant tremper des morceaux frais de cladodes dans de l'eau distillée pendant 5 min (AOAC, 2000).

II.3.4. Détermination du taux de solides solubles

Une goutte de la fraction liquide de la purée de cladodes a été mise sur la plaque du réfractomètre préalablement nettoyée avec l'eau distillée et séchée avec de l'alcool. Le degré Brix a été lu directement sur l'échelle à l'intersection de la limite entre la frange claire et la frange foncée (AOAC, 2002).

II.3.5. Détermination de la conductivité

L'électrode du conductimètre (HI2210, Roumanie) a été plongée dans une solution aqueuse à 20 % (P/V) de poudre de cladodes (Amellal, 2008) et la conductivité lue en siemens.

II.3.6. Dosage des glucides

Le dosage des sucres a été effectué selon la méthode de Dubois et al. (1956). En présence de phénol et d'acide sulfurique concentré, les oses donnent une couleur jaune-orange qui absorbe à $\lambda=490\text{nm}$ et dont l'intensité est proportionnelle à leur concentration (Nielsen, 1997).

L'extraction des sucres a été faite selon la méthode référencée de l'AOAC (2000) qui consiste à ajouter 30 mL d'éthanol à 80% (V/V) à 0.1 g d'échantillon suivi d'un repos de 48 h à température ambiante. On ajoute ensuite 20 mL d'eau distillée à l'extrait débarassé de l'alcool par étuvage à 80 °C pour obtenir la solution à analyser.

Dans un tube à essai, 1 ml de la solution à analyser a été additionné de 1 mL de phénol à 5% (V/V) et de 5 mL d'acide sulfurique concentré pur à 96%. Après 10 min, le mélange a été placé dans un bain marie pendant 20 min à 25 °C et la lecture de l'absorbance a été faite à 490 nm. La concentration en sucres totaux a été déterminée par extrapolation grâce à une courbe d'étalonnage établie avec différentes concentrations de glucose (0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/mL). La formule de calcul est la suivante :

$$\text{ST}(\%) = \frac{\text{X} \cdot \text{V} \cdot \text{D}}{\text{P}} \cdot 100$$

Avec :

ST : taux de sucres totaux (%), **X** : quantité de sucres calculée à partir à la courbe d'étalonnage (mg/mL), **D** : Facteur de dilution; **V** : volume de la solution analysée (mL); **P** : poids de la prise d'essai (g).

II.3.7. Dosage des lipides

Les lipides sont extraits en semi-continu à chaud avec de l'hexane grâce au dispositif de «Soxhlet » (AOAC, 1995). On verse 10 g de la poudre des jeunes cladodes dans une cartouche de cellulose qu'on place dans l'extracteur Soxhlet obstrué par un morceau de coton. Après 4 h d'extraction avec 150 mL d'hexane, les lipides sont pesés après élimination du solvant au rotavapor à 60°C. Si l'échantillon contient 8 à 10% d'humidité, il est recommandé d'effectuer un séchage par étuvage à 105°C.

Le taux de lipides est calculé par la formule :

$$TL(\%) = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \cdot 100$$

Dont : **TL(%)** : Taux de lipides (%), **P₀** : Poids de la prise d'essai (g), **P₁** : Poids du ballon vide (g), **P₂** : Poids du ballon + matière grasse (g).

II.3.8. Dosage des protéines

Les protéines totales ont été déterminées par la méthode de **Lowry et al. (1951)** dont le principe est basé sur la réaction de Biuret (réaction du cuivre sur les liaisons peptidiques en milieu alcalin donnant un complexe coloré) d'une part, et sur la réduction de l'acide phosphotungstomolybdique (réactif de Folin) par certains acides aminés comme la tyrosine, le tryptophane et la cystéine, d'autre part. La coloration bleue développée a une absorbance maximale entre 650 et 750nm.

La solution de prétraitement cupro-alcalin (appelée réactif de Gornall dans la méthode de Biuret) est préparée en solubilisant 20 g d'hydroxyde de sodium, 100 g de carbonate de sodium, 2 g de tartrate de potassium et de sodium et 0.5 g de sulfate de cuivre II pentahydraté dans 1000 mL d'eau distillée. Une solution aqueuse à 5% (P/V) de poudre de jeunes cladodes représente l'échantillon. Une courbe étalon est établie avec différentes concentrations (1 à 20mg/100mL) de SAB (sérum albumine bovine).

Le dosage consiste à faire réagir pendant 10min à température ambiante 1mL d'échantillon dilué (ou de solution SAB) avec 1 mL de la solution de prétraitement avant d'ajouter 4mL du réactif Folin-Ciocalteu dilué au 1/8^{ème} avec de l'eau distillée. La solution est incubée pendant 5min à 55±1 °C puis laissée refroidir pendant 30 min.

L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 750 nm contre un blanc qui comporte l'eau distillée à la place de l'extrait de cladodes et la quantité de protéines est obtenue par extrapolation à partir de la courbe étalon.

II.3.9. Détermination de la teneur en fibres

Les fibres brutes sont déterminées par la méthode de **Weende (1967)** qui consiste en une double hydrolyse acido-basique à chaud dans un but de solubiliser la quasi-totalité du contenu cellulaire à l'exception des fibres alimentaires et des sels minéraux.

La technique de quantification des fibres consiste à porter à ébullition le mélange de 1g de poudre des jeunes cladodes préalablement séché à 105 °C/3 h et de 150 mL d'acide sulfurique (1.25% : V/V) pendant 30 min. Le résidu est ensuite filtré, lavé 3 fois avec l'eau distillée chaude (100°C) et additionné de 150 mL de solution d'hydroxyde de potassium à 1.25% (P/V) avant d'être porté à ébullition une deuxième fois durant 30 min (AOAC, 2000).

Le résidu subit une série de lavages : trois fois à l'eau distillée chaude, une fois à l'eau distillée froide et une fois à l'acétone (3 x 25 mL), avant d'être séché à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le dernier résidu composé de fibres et de minéraux a été incinéré dans un four à moufle pendant 3 h à 550 °C (AOAC, 2000). La formule suivante permet d'estimer le taux de fibres brutes (FB%) :

$$FB(\%) = \frac{P1 - P2}{P0} \cdot 100$$

Où : **FB (%)** : Taux de fibres brutes (%), **P₁** : Poids du creuset après étuvage (g), **P₂** : Poids du creuset après incinération(g), **P₀** : Prise d'essai (g).

Le dosage des pectines, en tant que fibres solubles, a été réalisé selon la méthode de **Khule et al. (2012)**. Un volume de 2mL de broyat de jeunes cladodes est mélangé avec 6mL d'éthanol à 80% dans un milieu acide (pH= 1.5). Ce mélange est centrifugé à 8000 tr/min durant 15min et le culot récupéré est mis en étuve à 50°C. Ainsi, le pourcentage de pectine dans le broyat est calculé par une différence de masses.

II.3.10. Dosage de la vitamine C

L'acide ascorbique est dosé directement par iodométrie (**NF ISO 3961 9-96 ; citée par Boutakiout, 2015**). L'acide ascorbique est oxydé par une solution de diiode (I₂) en excès, le diiode restant est dosé par une solution de thiosulfate de sodium. Un titrage est réalisé avec l'ajout du thiosulfate de sodium (0.005 M) jusqu'à disparition de la couleur foncée des 5mL d'échantillon (broyat de jeunes cladodes) mis en réaction avec 5mL de solution de diiode 5mM additionnés d'empois d'amidon. La concentration d'acide ascorbique du jus est calculée par soustraction du nombre de moles de diiode qui ont réagi avec le thiosulfate de celles de départ (**Boutakiout, 2015**).

II.3.11. Dosage des minéraux

Le calcium (Ca), potassium (K) et sodium (Na), ont été quantifiés par spectrophotométrie à flamme (Jenway™ PFP7, France) (**Soualem, 2010**). Une pincée de 0.05g de cendres est

dissoute dans 4 mL d'acide nitrique, puis placée au bain de sable jusqu'à l'évaporation de l'acide nitrique. On ajoute 10mL d'HCl 0.1N et on filtre le mélange. L'eau bi-distillée est employée pour étalonner l'appareil à 0 ppm, tandis que le taux de chaque élément est déduit en projetant la valeur d'émission sur sa propre courbe d'étalonnage.

II.3.12. Dosage de la chlorophylle

Le taux de chlorophylle a été mesuré selon la méthode décrite par **Lichtenthaler (1987)**, et qui consiste à extraire 0.1 g de matière fraîche avec 10mL d'acétone à 80% (V/V). La solution est filtrée sur papier filtre et placée dans des tubes Eppendorff qui seront centrifugés à 13000 tr/min pendant 20 min afin d'éliminer tous les débris végétaux précipités en culot.

La quantité en ($\mu\text{g/mL}$) de la chlorophylle a (C_a), b (C_b) a été déterminée selon la formule de **Lichtenthaler (1987)**, sachant que ces pigments absorbent la lumière à 663.2 et 646.8, respectivement.

- Chlorophylle a : $C_a = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$ ($\mu\text{g/mL}$ solution)
- Chlorophylle b : $C_b = 21.50 A_{646.8} - 5.10 A_{663.2}$ ($\mu\text{g/mL}$ solution)

II.4. Méthodes d'analyse des métabolites secondaires

II.4.1. Méthodes d'analyse des substances phénoliques

II.4.1.1. Extraction des substances phénoliques

L'extraction des polyphénols a été conduite selon le protocole décrit par **Merghem et al. (1995)** qui consiste à macérer 10g de poudre de jeunes cladodes dans le mélange méthanol-eau (1.3/8.7: V/V), à un rapport de 1/10 (P/V) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps.

Les macérats sont réunis puis filtrés sur un papier filtre et le filtrat est débarrassé du solvant par évaporation à 40 °C sous pression réduite au moyen d'un évaporateur rotatif. L'extrait sec obtenu est ensuite pesé et repris dans de l'eau distillée, puis conservé à l'abri de l'air, de la lumière et de la chaleur. Le rendement d'extraction est calculé comme suit (**Bruneton, 1999**):

$$R\% = \frac{P_2 - P_1}{M}$$

Avec : **P₁**: Poids du ballon vide, **P₂** : Poids du ballon et de l'échantillon après évaporation, **M**: Masse initiale d'échantillon.

II.4.1.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode décrite par **Singleton et al. (1999)** utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Pour ce faire, 1mL d'extrait des polyphénols a été ajouté à 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et laissé reposer 4min avant l'ajout de 8ml de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 7.5% (P/V) suivi d'une douce agitation. Le mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 2h dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 765 nm par un spectrophotomètre UV-VIS (Jenway™ 7315, United Kingdom).

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage, établie avec l'acide gallique et exprimée en microgrammes d'équivalents acide gallique par gramme de matière sèche de cladode (mg EAG/g MS).

II.4.1.3. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage colorimétrique des flavonoïdes totaux dans les jeunes cladodes est réalisé selon la méthode de **Djeridane et al. (2007)**. Le mélange formé par 1mL d'extrait phénolique de jeunes cladodes frais et 1mL de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2% (P/V) est laissé réagir pendant 15min à température ambiante. L'absorbance a été lue au spectrophotomètre UV-visible à 430 nm. Le blanc est représenté par du méthanol additionné à l' AlCl_3 .

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine, les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine/g matière sèche de cladode (mg EQ/g MS).

II.4.1.4. Dosage des flavones et flavonols

La méthode utilisée pour le dosage de ces deux flavonoïdes est celle décrite par **Kosalec et al. (2005)** qui consiste à incuber à température ambiante pendant 30min le mélange réactionnel suivant : 0.5 mL d'extrait de polyphénols, 1.5 mL d'éthanol 95% (v/v), 0.1 mL de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 10 % (P/V), 0.1 mL d'acétate de sodium 1M et 2.8 mL d'eau distillée. La lecture de l'absorbance de ce mélange à 415nm (spectrophotomètre UV-VIS Jenway™ 7315, United Kingdom) permet d'exprimer la concentration des flavones et flavonols en mg équivalent en quercétine/g matière sèche de cladode (mg EQ/g MS) en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine comme standard.

II.4.1.5. Dosage des tannins condensés

Ce dosage a été réalisé selon la méthode colorimétrique de **Joslyn (1970)** modifiée par **Boutakiout *et al.* (2015)**. 0.5mL d'extrait phénolique dilué au 1/10 par un mélange eau/méthanol (2V:3V) est additionné à 2.5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu et 5mL de carbonate de sodium à 7,5 % (P/V). Le mélange a été laissé reposer pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité, avant d'être incubé pendant 5 min à 55 °C puis refroidi dans de l'eau de robinet pendant 30 min.

La lecture d'absorbance a été faite à 760 nm et les résultats sont obtenus par extrapolation sur une courbe étalon d'acide tannique et exprimés en mg Equivalent Acide Tannique /g matière sèche de cladode (mg EAT/g MS).

II.4.1.6. Dosage des tannins hydrolysables

Les tanins hydrosolubles sont déterminés par la méthode de **Willis et Allen, (1998)**. Une mixture de 0.5mL d'extrait phénolique dilué au 1/10^{ème} dans le mélange eau/méthanol (2V:3V) et de 2.5mL de la solution d'iodate de potassium à 2.5% (P/V) a été laissée au repos dans l'obscurité pendant 4 min à température ambiante. L'absorbance mesurée à 550 nm mesurée à 550 nm est proportionnelle à la quantité de tannins hydrolysables obtenue par extrapolation sur une courbe étalon d'acide tannique et qui est exprimée en mg Equivalent Acide Tannique/g matière sèche de cladode (mg EAT/g MS).

II.4.2. Méthode d'extraction et de dosage des bétalaïnes

L'extraction des bétalaïnes consiste, selon **Castellanos-Santiago et Yahia (2008)**, à agiter un mélange de 100 mg de poudre de cladodes et 20mL de tampon citrate-phosphate (pH 6.5) à l'obscurité pendant 10 min qui est ensuite centrifugé à 12000xg à 15 °C pendant 15 min. Le surnageant récupéré est filtré sur un filtre en nylon de 0.45µm. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre UV-VIS (Jenway™ 7315, United Kingdom) à 538 nm pour les bétacyanines et à 480 nm pour les bétaxanthantines. La teneur en bétalaïnes (**BC**) a été calculée comme décrit par **Stintzing *et al.* (2003)**:

$$BC \text{ (mg / L)} = \frac{A * DF * MW * 1000}{\epsilon \times l}$$

Où: **A**: Absorbance, **DF**: Facteur de dilution et **l**: Longueur du trajet optique (épaisseur de solution traversée par la lumière) (largeur de la cuvette=1cm).

Pour la quantification des bétacyanines et des bétaxanthines ; le poids moléculaire (MW) et le coefficient d'extinction molaire (ϵ) sont respectivement :

- Pour la bétanine (MW = 550 g / mol; ϵ = 60 000 L / mol.cm; λ =538 nm)
- Pour l'indaxanthine (MW = 308 g / mol; ϵ = 48 000 L / mol.cm; λ =480 nm).

II.4.3. Méthode d'extraction et de dosage des caroténoïdes

La méthode de **Sass-kiss et al. (2005)** a été adoptée pour extraire les caroténoïdes. Elle consiste à homogénéiser 4g de poudre de jeunes cladodes avec 10mL de mélange de solvants (hexane/acétone/éthanol) (1V:2V:2V) pendant 15min ; cela est suivi par une centrifugation à 5500tours/min à 4 °C pendant 15min. La couche supérieure d'hexane contenant le pigment est prélevée et son absorbance mesurée à 430nm. La teneur en caroténoïdes totaux est exprimée en mg d'équivalent β -carotène pour 100 g par extrapolation sur une courbe étalon de β -carotène.

II.4.4. Méthode d'extraction et de dosage des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont extraits par la technique de **Bruneton (1999)** qui consiste à délipider 10 g de poudre de cladodes durant 3h avec 250mL d'éther de pétrole sous agitation à température ambiante et ensuite à alcaliniser le milieu par addition de 40mL d'ammoniaque 0.5N pendant au moins 8h à température ambiante, permettant ainsi aux alcaloïdes, de passer de la forme sel à la forme organique.

La poudre alcalinisée a été épuisée des traces de lipides pendant 3 à 4h (au moins 5 cycles) par 250 mL de dichlorométhane au Soxhlet. A l'issue de cette opération, l'extrait brut d'alcaloïdes a été purifié par trois extractions successives (3x150mL) à l'acide sulfurique 0.5N et les trois fractions étaient reprises dans une ampoule à décantation pour les alcaliniser jusqu'à pH 9 par l'ajout d'ammoniaque 0.5 N.

Un deuxième épuisement de l'extrait est effectué par le chloroforme (3x150mL) en agitant doucement l'ampoule à chaque fois, suivi d'une filtration/déshydratation des trois fractions organiques réunies sur papier filtre soutenant du sulfate de sodium anhydre. Le chloroforme est éliminé par évaporation à 40°C sous pression réduite au rotavapor et le résidu sec obtenu représente les alcaloïdes totaux qui seront pesés, resolubilisés dans le chloroforme et conservés à l'abri de la lumière et de la chaleur.

II.4.5. Fractionnement et analyse qualitative des métabolites secondaires d'extrait de cladode par chromatographie

II.4.5.1. Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les polyphénols de nopals ont été fractionnés et identifiés par un chromatographe en phase liquide de marque Young line YL9100 (dégazeur YL9101, pompe quaternaire YL9110, four YL9131, bain à ultrasons biolock, modèle 88156) couplé à un spectrophotomètre UV-Visible de marque YL9120. Un volume d'injection de 20 μL a été filtré par un filtre seringue 0.45 μm , avant son introduction dans une colonne C18 (Restek Pinnacle II 5 μm), d'une longueur de 15 cm et d'un diamètre intérieur de 4.6 mm, à une température de 25 °C.

L'élution en gradient a été mise en œuvre par deux solvants de qualité HPLC formant la phase mobile à un débit de 1mL/min. La phase A: solution H₂O ultra-pure acidifiée avec 1% (V/V) d'acide acétique, la phase B: méthanol pure. La séparation commence par (95% A – 5% B), suivie d'un gradient linéaire (5% A- 95% B) en 55min, et finalement un retour vers les conditions initiales (95% A- 5% B) en une minute.

La séparation des polyphénols a été suivie à 254nm. L'identité des pics chromatographique a été faite par comparaison aux étalons et des temps de rétention.

II.4.5.2. Analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG-MS)

L'analyse CG-MS de l'extrait des alcaloïdes a été réalisée par injection directe de 0.3 μL en mode split (1:100) dans un chromatographe en phase gazeuse (Brucker ScionSQ, Pays-Bas) équipé d'une colonne capillaire DB-5 (25 m de longueur x 0.22 mm de diamètre interne x 0.25 μm d'épaisseur de film), et couplé au spectrophotomètre de masse (SQ: Single Quadripole, Pays-Bas) fonctionnant en impact électronique (EI) à 70 eV, balayant la gamme m/z 35-600.

La température initiale de la colonne a été réglée à 200°C pendant 0.8 min puis augmentée à 250 °C à une vitesse de 10°C/min pour être maintenue à cette température pendant 24 min. Le débit d'hélium comme gaz vecteur était de 1 mL/min tandis que la température de la chambre d'injection était de 250 °C.

La comparaison des spectres de masse des composés avec ceux de la bibliothèque du NIST et de la littérature nous a permis de révéler l'identité des alcaloïdes de l'extrait de nopals.

II.5. Méthodes d'évaluation des propriétés biologiques d'extrait de cladodes

II.5.1. Détermination de l'activité antioxydante

II.5.1.1. Par la méthode de piégeage du radical libre le 2, 2-diphényl-1-picryl hydrazyl

(DPPH°)

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est réalisé selon la méthode décrite par **Blios (1958)**. Le DPPH est un radical libre violet qui devient jaune quand il est réduit en diphényl picryl hydrazine par un donneur de proton (représenté ici par l'antioxydant). Ce produit de réduction du DPPH a une absorbance maximale à 517nm, laquelle est proportionnelle au pouvoir de l'antioxydant à donner des électrons. La procédure consiste à mélanger 1mL de chaque métabolite de cladodes à différentes concentrations (31.25, 62.50, 125, 250 µg/mL) à 1 mL de la solution éthanolique de DPPH 0.06 mM et qu'on laisse au repos pendant 30 min dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 517 nm contre un témoin négatif préparé en substituant les métabolites par de l'éthanol pur, alors que l'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans la même plage de concentration que les métabolites. L'efficacité anti-oxydante est exprimée selon la relation suivante:

$$IE\% = 100 \cdot \frac{A(\text{témoin}) - A(\text{échantillon})}{A(\text{échantillon})}$$

Où: **IE%**: pourcentage d'inhibition du DPPH, **A(témoin)**: l'absorbance du témoin, et **A(échantillon)**: l'absorbance des métabolites extraits de cladodes.

La valeur IC₅₀, définie comme la concentration d'extrait requise pour fournir 50% de l'activité de piégeage, a été calculée à partir du graphique [% d'inhibition = f (concentration)].

II.5.1.2. Par la méthode du « Ferric reducing antioxydant power » (FRAP)

Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés par le suivi de la réaction colorimétrique de réduction fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) d'un complexe ferricyanide de couleur bleue, dont le pic d'absorption est à 700 nm (**Ou et al., 2001; Chung et al., 2002**). Le pouvoir réducteur a été déterminé par la méthode modifiée d'**Oyaizu (1986)**.

La manipulation consiste à mélanger 200µL d'extrait de cladodes à différentes concentrations (15.75, 31.25, 62.50, 125, 250 µg/mL) avec 500µL de tampon phosphate (0.2M, pH 6.6) et 500µL d'hexacyanoferrate de potassium (1% : P/V) [K₃Fe(CN)₆]. Après avoir chauffé

le mélange à 50°C au bain-marie pendant 20min, on ajoute 500 µL d'acide trichloracétique (10% : P/V) et on centrifuge à 3000 tours/min pendant 10min. Par la suite, un aliquote de 500µL de surnageant a été mélangé avec 500 µL d'eau distillée et 100µL de FeCl₃ à 1% (P/V) fraîchement préparé. L'absorbance a été lue à 700 nm par rapport à un blanc contenant du méthanol et comparée à l'acide ascorbique comme antioxydant standard. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

II.5.1.3. Par le test du blanchiment du β-carotène

La capacité des métabolites secondaires de nopals à neutraliser l'oxydation du β-carotène par les peroxydes lipidiques de l'acide linoléique, conduisant à sa décoloration, a été évaluée selon la méthode décrite par **Kartal *et al.* (2007)**. L'émulsion β-carotène/acide linoléique est préparée par solubilisation de 0.5 mg de β-carotène dans 1mL de chloroforme, 25µL d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation totale du chloroforme à 40°C au rotavapor, on ajoute 100mL d'eau distillée saturée d'oxygène ; l'émulsion résultante est vigoureusement agitée. Un volume de 350µL d'extrait à 31.25, 62.50, 125, 250 µg/mL ou d'acide ascorbique à 250 µg/mL est ajouté à 2.5 mL de l'émulsion fraîche précédente avant incubation à 50°C au bain-marie. Le contrôle négatif contient du méthanol à la place d'extrait de cladodes.

La cinétique de décoloration de l'émulsion avec et sans extraits de cladodes est suivie à 490 nm pendant 2h à un intervalle de 15min. L'activité antioxydante des extraits est calculée selon l'équation suivante:

$$AA = 100 \times [1 - (AE_0 - AE_{120}) / (AC_0 - AC_{120})]$$

Avec: **AE₀** et **AE₁₂₀**: Absorbance des échantillons à 0 et 120 min, **AC₀** et **AC₁₂₀**: Absorbance du contrôle à 0 et 120 min.

II.5.2. Détermination de l'activité anti-inflammatoire

II.5.2.1. Par le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA)

Ce test est réalisé selon la méthode décrite par **Erianti *et al.* (2015)**. Trois aliquotes de 0.45 mL d'une solution aqueuse d'albumine sérique bovine (BSA) (5% : P/V) répartis dans des tubes à essai, ont été mélangés avec 0.05mL de différentes concentrations d'extrait de cladodes (15.75, 31.25, 62.50, 125, 250 µg/mL) et de diclofénac de sodium (15.75, 31.25, 62.50, 125, 250 µg/mL) comme anti-inflammatoire de référence. Un tube à essai a été réservé pour 0.05 mL d'eau distillée (témoin négatif) à la place de l'échantillon. Un mélange de 0.45mL d'eau distillée

à la place d'albumine sérique bovine et de 0.05mL d'extrait de cladodes représente la solution du contrôle de la protéine (contrôle de produit).

Toutes les solutions ont été ajustées à un pH 6.3 par une solution de HCl1N avant d'être incubées à 37°C pendant 20 min puis maintenues à 57°C pendant 3 min. Après refroidissement, 2.5mL de tampon phosphate salin (pH = 6.3) ont été ajoutés à chaque tube. L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 416 nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \frac{\text{Abs solution d'essai} - \text{Abs controle d'essai}}{\text{Abs contrôle de produit}} \times 100$$

II.5.2.2. Par le test de stabilité de la membrane des globules rouges humains vis-à-vis de

l'hémolyse (HRBC: Human Red Blood Cell membrane stability test)

Le protocole de **Ganesh Gadamsetty et al. (2013)** a été utilisé pour évaluer l'effet des extraits de nopals sur la stabilisation des érythrocytes, après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique associée à une température élevée. Pour ce faire, 6mL de sang humain frais ont été prélevés sur des volontaires sains n'ayant pris aucun médicament stéroïdien au cours des deux dernières semaines, puis centrifugés à 3000xg pendant 5min. Le culot de cellules a été lavé avec un volume égal de solution saline normale (pH 7.4) puis centrifugé à nouveau. Ce cycle centrifugation/lavage a été répété jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair. Une suspension de globules rouges humains 10% (v/v) a été préparée avec une solution saline normale et utilisée immédiatement.

Un volume de 1mL d'extraits de nopals à différentes concentrations (15.75, 31.25, 62.5, 125 et 250µg/mL) est ajouté à 1mL de tampon phosphate (0.15 M, pH 7.4), 2 mL de la solution hyposaline (NaCl à 0.36 %: P/V) et 0.5 mL de la suspension érythrocytaire (10 %). Les mélanges ont été incubés à 56 °C pendant 30min puis refroidis durant 20 min et centrifugés 5 min à 3000 rpm.

L'absorbance des surnageants récupérés a été lue à 560 nm contre une solution tamponnée de chlorure de sodium servant de blanc, et comparée au diclofenac sodium comme étant standard positif. La solution saline isotonique a remplacé l'extrait dans le contrôle sanguin et la suspension érythrocytaire dans le contrôle d'extrait. Le pourcentage d'activité de stabilisation de la membrane a été déterminé en utilisant l'équation d'**Oyedapo et Famurewa (1995)**:

$$\% \text{ Stabilité membranaire} = 100 - \left[\frac{\text{Abs d'extrait} - \text{Abs contrôle extrait}}{\text{Abs contrôle sang}} \right]$$

II.5.3. Détermination de l'activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des extraits de nopals est déterminée selon la méthode décrite par Athukorala *et al.* (2007). Le sang collecté de chez dix jeunes volontaires sains, consentants et sans antécédents de thrombose ou de saignement, est mélangé avec le citrate de sodium (3.2% : P/V) dans un rapport de 1V/9V, puis centrifugé à 2400xg pendant 20 min. Le plasma débarrassé des plaquettes est conservé à -60°C jusqu'à son utilisation.

Les tests de temps de thromboplastine partielle activée (APTT) et de temps de prothrombine (PT) consistaient à mélanger 90µL de plasma avec 10µL de différentes concentrations d'extraits de nopals (31.25; 62.5; 125 et 250 µg/mL) et de les chauffer à 37°C pendant 1 et 10 min, respectivement.

II.5.3.1. Par la détermination du Temps de Céphaline-Kaolin (TCK) ou Temps partiel de thromboplastine activée (APTT)

100 µL de réactif APTT ont été ajoutés au mélange précédent avant incubation à 37 °C pendant 5 min. L'APTT a été enregistrée après activation de la coagulation par 100µL de CaCl₂ (0.025 M), en considérant la solution de NaCl à 0.9% (P/V) et l'héparine comme témoins négatif et positif.

II.5.3.2. Par la détermination du Temps de Quick (TQ) ou Temps de Prothrombine (TP)

Le test TP a été réalisé après induction de la coagulation en utilisant 200µL de réactif TP pré-incubé (37°C pendant 10 min). Le TP a été enregistré en tenant compte des mêmes contrôles négatif et positif.

II.5.4. Détermination de l'activité antimicrobienne

Dans cette partie, la sensibilité de six souches bactériennes pathogènes, une bénéfique ainsi qu'une levure, vis-à-vis d'extraits de nopals a été évaluée.

II.5.4.1. Réactivation des souches

Les souches bactériennes ont été revivifiées avant leur utilisation à 37°C durant 18h dans des bouillons appropriés ; le milieu BHIB pour les bactéries pathogènes, le milieu MRS pour la

souche bénéfique. La levure a été réactivée dans le milieu Sabouraud pendant 48h à 25°C (**De Mann et al., 1960; Kishor, 2005**).

L'objectif est d'atteindre une turbidité de 0.5 MacFarland, équivalente d'une densité optique mesurée à 600nm comprise entre 0.08 et 0.1 pour les bactéries, et entre 0.12 et 0.15 pour la levure ; ce qui correspond respectivement à 10^8 et 10^6 UFC/ml (**Haddouchi et al., 2009**).

II.5.4.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose

Cette analyse préliminaire de l'effet antimicrobien des extraits de nopals a été effectuée selon la méthode de diffusion sur puits d'agar (AWDT : Agar Well Diffusion Test) qui consiste à ensemercer des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton par 100µL de la suspension bactérienne fraîche, ajustée par turbidité à 10^8 UFC/mL. Le milieu Sabouraud est employé pour ensemercer les levures à 10^6 UFC/ml (**Haddouchi et al., 2009**).

Après 15 mn, les puits de 6 mm de diamètre réalisés dans la gélose ensemencée, ont été remplis par 50 µl des différents extraits dissous dans le DMSO (dimethyl sulfoxide) à raison de 2 mg/mL. Les boîtes subissent ainsi une pré-incubation à 4 °C pendant 2h afin de permettre la diffusion radiale de l'agent inhibiteur, suivie d'une incubation de 24h à 37 °C pour les bactéries et de 48h à 25°C pour les levures. L'activité antimicrobienne est déduite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition entourant les puits (**Haddouchi et al., 2009; Das et al., 2010**).

II.5.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice a été déterminée en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide citée par **Sanchez et al. (2014)**. Des puits de micro-plaques 96 contenant 100 µL de chaque suspension microbienne (10^6 UFC/mL, concentration finale), sont additionnés de 100 µL d'extraits de nopals (2 mg/mL, concentration maximale) dilués en série d'une façon géométrique à raison de 2.

Des puits avec milieu de culture seul ou avec suspension bactérienne sans extrait de nopals ont été considérés comme témoins. L'incubation des plaques a été faite à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48h pour les levures. La CMI a été définie comme la plus faible concentration d'extrait qui a inhibé la croissance visible des bactéries (**Ncube et al., 2008**).

II.5.4.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)

La CMB et la CMF ont été déterminées par ensemencement sur gélose appropriée d'un aliquote de 25 µL des puits ayant une concentration égale ou supérieur à la CMI (**Sanchez et al., 2010; Daoud et al., 2019**). Les concentrations minimales bactéricide et fongicide ont été définies comme les plus faibles concentrations d'extrait auxquelles aucune croissance microbienne n'a été détectée dans les plaques (**Sanchez et al., 2010; Zarrin et al., 2010**)

II.5.5. Détermination de l'activité anti-tumorale de l'extrait de cladode

II.5.5.1. Nature, origine et technique de mise en culture des cellules tumorales HepG2

Les hépatocytes humains de la lignée cancéreuse (HepG2) (département des sciences de l'institut des sciences de la santé-Nord, CESPU, CRL, Gandra, Portugal) ont été cultivées dans des flacons de 75mL contenant le milieu d'Eagle modifié par Dulbecco DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) hautement glucosé, et additionné de 10% (V/V) de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur (Heat Inactivated Foetal Bovine Serum HI-FBS) et de 1% (V/V) de solution d'antibiotiques (10000 U/mL de pénicilline, 10000µg/mL de streptomycine) (**Dias da Silva et al., 2015**).

Les cellules sont maintenues à 37 °C sous atmosphère humidifiée (5% CO₂-95% air) avec un changement de milieu de culture chaque 2 à 3 jours. Les cultures ont subi une trypsination (0.25%: P/V trypsine/1mM EDTA) quand la confluence cellulaire atteint 70-80%, et ont été repiquées sur un maximum de 10 passages (**Dias da Silva et al., 2015**).

II.5.5.2. Choix des doses d'extrait de cladodes et durée de leur confrontation aux cellules tumorales HepG2.

Pour réaliser les tests de cytotoxicité, les cellules sontensemencées à une densité de 8.10⁴ cellules/puits, dans des microplaques 96 puits à des volumes de 100 µL de milieu de culture complet, puis incubées 24h dans les conditions précédentes (**Dias da Silva et al., 2015**).

Le jour suivant, les cellules sont exposées aux différents extraits de nopals à raison de 100µL selon une gamme de concentrations de l'ordre de 0.25, 0.5 et 1mg/mL, dans le même milieu de culture dépourvu de FBS. Les extraits ont été fraîchement préparés dans le DMSO de sorte que sa concentration n'excède jamais le 1% dans le milieu d'exposition (**Dias da Silva et al., 2015**).

Le contrôle du solvant (solution DMSO) et le contrôle négatif (culture cellulaire sans extrait) ont été lancés parallèlement à l'incubation des extraits dans tous les tests (**Dias da Silva et al., 2015**).

II.5.5.3. Evaluation de la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode de réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT)

Cette analyse mesure l'activité de la succinate déshydrogénase capable de convertir le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) soluble de couleur jaune, en sels de formazan insolubles de couleur pourpre. De ce fait, cette enzyme est un indicateur d'activité métabolique des mitochondries et donc de la viabilité cellulaire.

En suivant le protocole décrit par **Dias da Silva et al. (2015)**, le milieu de culture des cellules de 24h, cultivées en présence d'extraits de nopals, a été aspiré et remplacé par 100µL d'une solution fraîche de MTT (0.5 mg/mL dans HBSS "Hanks' Balanced Salt Solution", Gibco laboratories, Lenexa, KS, USA). Après l'incubation des plaques à 37 °C pendant 30min, la solution MTT a été retirée et les cristaux de formazan formés ont été dissous dans 100 µL de DMSO. La lecture d'absorbance a été faite à 550 nm dans un lecteur de plaque à puits multiples BioTek Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc. USA) après 15 min d'agitation.

Chaque concentration a été testée en double dans trois expériences indépendantes, effectuées à l'abri de la lumière en raison de la photosensibilité du MTT, et les résultats ont été présentés graphiquement en pourcentage de prolifération cellulaire en fonction de la concentration d'extrait (mg/mL). Le Triton X-100 est utilisé comme témoin positif au taux de 1%.

II.5.5.4. Evaluation de la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode d'inclusion lysosomale du rouge neutre

Pour fournir des données supplémentaires sur la viabilité des cellules, nous avons effectué le test d'absorption du rouge neutre (RN) décrit par **Arbo et al. (2014)** avec des modifications mineures. Cet essai repose sur la capacité des cellules viables à incorporer et à lier le colorant cationique faible RN, qui pénètre dans les cellules par diffusion non ionique et s'accumule dans les lysosomes par interaction avec les sites anioniques de la matrice des organites.

À la fin de la période d'incubation (24h) des hépatocytes ensemencés sur des plaques à 96 puits, en présence de nos extraits, le milieu d'exposition a été remplacé par 100 µL d'une solution de RN à 50 µg/mL, préparée dans du HBSS. Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ pendant 30 min, permettant aux lysosomes des cellules viables d'incorporer le colorant. Les cellules ont ensuite été soigneusement lavées deux fois avec 200 µL de HBSS pour éliminer le colorant extracellulaire, puis lysées avec 100 µL de solution de lyse (éthanol à 50%: acide acétique glacial à 1%: eau à 49%). Le Triton X-100 (1%) représente le contrôle positif.

L'absorbance a été mesurée à 540 nm dans un lecteur de plaques à puits multiples BioTek Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc.). Les données obtenues ont été présentées graphiquement en pourcentage des contrôles négatifs.

II.5.5.5. Evaluation de la viabilité des cellules tumorales HepG2 après inhibition du cytochrome P450

Afin de déterminer l'influence du métabolisme du cytochrome P (CYP) sur la toxicité des extraits, les isoformes CYP2E1 et CYP2D6 des cellules HepG2 ont été inhibées avant et pendant l'exposition aux extraits testés. Ensuite, la viabilité cellulaire a été évaluée en utilisant le test MTT comme décrit auparavant (**Dias-da-Silva et al., 2015**).

Les cellules ont été incubées pendant 1h avec 100 µL d'une solution d'inhibiteur du CYP; la métyrapone (inhibiteur du CYP2E1) à 500 µM et la quinidine (inhibiteur du CYP2D6) à 10 µM. La concentration d'inhibiteur a été sélectionnée afin d'induire une inhibition sans provoquer de cytotoxicité. Ce mélange (cellules/inhibiteurs) a été ensuite co-incubé avec les extraits à tester, pendant 24 h à 37 °C. La viabilité cellulaire a été évaluée en utilisant le test MTT décrit ci-dessus, et les résultats ont été normalisés en témoins positifs (Triton X-100 à 1%) et négatifs. Des contrôles inhibiteurs (les inhibiteurs seuls dans le milieu de culture cellulaire) ont été réalisés et comparés à des contrôles négatifs pour s'assurer qu'aucune cytotoxicité ne découle de ces traitements (**Dias-da-Silva et al., 2015**).

II.5.5.6. Détermination du taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NOS)

La production intracellulaire de ROS et de RNS a été contrôlée à l'aide du dosage de fluorescence du diacétate de 2', 7'-dichlorodihydrofluorescéine (DCFH-DA), décrit par **Dias da Silva et al. (2015)**.

Brièvement, les hépatocytesensemencés sur des plaques à 96 puits, ont été exposés dans l'obscurité à 100µL de DCFH-DA (10µM) à 37°C pendant 30 min. Le DCFH-DA étant une poudre non soluble dans l'eau, a été préparé initialement sous forme de solution mère à 4 mM dans du DMSO et ajusté à la concentration finale dans un milieu de culture frais (en veillant à ce que la concentration finale en DMSO ne dépasse pas 0.05%), immédiatement avant chaque expérience.

Ensuite, les cellules ont été lavées avec du HBSS et incubées avec les extraits à tester, à 37°C pendant 24h. La fluorescence a été enregistrée à la fin de la période d'incubation en utilisant un lecteur de microplaques à fluorescence BioTek Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc.), réglé sur une excitation à 485 nm et une émission à 530 nm. Les données acquises ont été normalisées aux conditions du contrôle négatif (milieu de culture cellulaire seul).

II.5.5.7. Détermination du potentiel membranaire mitochondrial

L'intégrité mitochondriale a été évaluée à l'aide d'ester éthylique de tétraméthylrhodamine (TMRE), un colorant chargé positivement inclus uniquement dans les mitochondries actives.

D'après **Dias da Silva *et al.* (2015)**, les hépatocytes co-incubés avec les extraits de nopals Algériens sur des plaques à 96 puits, ont été débarrassés de milieu de culture et lavés deux fois par le HBSS (sans calcium ni magnésium). Les cellules ont été additionnées par la suite par 100µL de TMRE frais (2µM), puis incubées à 37°C pendant 30 min à l'abri de la lumière. Après l'incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec du HBSS (sans calcium ni magnésium) et la fluorescence a été quantifiée à l'aide d'un lecteur de microplaques à fluorescence BioTek Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc.), à une excitation et une émission respectives de 544 nm et 590 nm. Les données reçues ont été normalisées en contrôles négatifs.

II.6. Analyse statistique des résultats

Les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart-type de trois déterminations indépendantes, et l'analyse de la variance ANOVA a été effectuée par le logiciel IBM SPSS Statistics 26.0. Les différences entre les moyennes ont été considérées comme significatives par le test de Tukey à $p < 0.05$.

Chapitre III
Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Macrocomposition et caractéristiques physicochimiques du nopal d'Algérie

Le tableau 3 présente la macrocomposition et les caractéristiques physicochimiques et biochimiques des nopals Algériens.

Tableau 3 : Caractéristiques physicochimiques et biochimiques des nopals d'*O. ficus indica* d'Algérie.

Paramètre	Valeur	Paramètre	Valeur
Humidité	87.1±0.9	Cendres	11.84±0.5
Matière sèche	12.19±1.1	Ca ²⁺	9.04±1.21
Sucres	4.5±0.22	K ⁺	1.10±0.43
Protéines	3.24±0.49	Mg ²⁺	1.07±0.08
Lipides	0.24±0.01	pH	4.05±0.31
Pectines	1.69±0.06	Conductivité	(µS.cm ⁻¹) 382±2.01
Fibres brutes	(% MS) 9.14±0.3	Solides solubles	(Brix°) 4.80±0.55
Vitamine C	(mg/100ml) 7.04±0.30		
Chlorophylle a	(mg/100gPF) 0.322±0.034		
Chlorophylle b	0.131±0.069		

III.1.1. Humidité, taux de cendres et minéraux

Le taux d'humidité de nopals Algériens estimé dans cette étude à 87.1±0.9% PF, est très comparable au 87% rapportés par **Chiteva et Wairagu (2013)**. La teneur en eau des cladodes se fluctue entre 80 et 95% ; une proportion importante qui s'explique en partie par leur rôle de stockage hydrique (**Stintzing et Carle, 2005; Gungor et Sengul, 2008; Benattia, 2017**). En prenant en considération les différences entre les écotypes remarquées par **El Kharrassi (2015)**, l'étude de **Stintzing et Carle (2005)** montre que les nopals à leur jeune stade de développement emmagasinent plus d'eau.

La teneur en cendres enregistrée dans les jeunes cladodes a été 11.84±0.5% MS, où elle est très proche du minimum de la fourchette 12.97 - 25.65 % rapportée par **El Kharrassi (2015)** avec des différences significatives au sein des espèces de figue de barbarie. Cette mesure des minéraux présents dans le nopal dépend du sol, du climat et des facteurs génétiques (**Athamena, 2009; Gaouar, 2011**).

L'analyse de la composition des nopals en principaux éléments minéraux par rapport à ma matière sèche met en évidence la prédominance du calcium ($9.04\pm 1.21\%$), suivi du potassium ($1.10\pm 0.43\%$) et du magnésium ($1.07\pm 0.08\%$). Cette distribution observée pour ces trois minéraux dans nos échantillons est en concordance avec ce qui a été publié par **Paiva et al. (2016)**. Etant donné le degré de variabilité de la composition minérale des nopals en fonction des espèces, de l'état physiologique du tissu de cladode et du site de culture, ces valeurs restent approximatives (**Stintzing et Carle, 2005**).

Benattia (2017) a rapporté que les nopals sont une source importante de minéraux. Le niveau de calcium dans les nopals surpasse celui des légumes de consommation courante comme les épinards et la carotte, et reflète alors son rôle crucial dans la rétention d'eau de ces tissus succulents (**Tirilly et Bourgeois, 1999; Stintzing et Carle, 2005**). Or, la teneur élevée en potassium et la faible teneur en sodium offrent des bénéfices nutritionnels clairs pour les personnes ayant des problèmes de reins et d'hypertension.

III.1.2. pH, conductivité et solides solubles

Dans cette étude, nos nopals ont un pH égal à 4.05 ± 0.31 qui est légèrement plus acide à celui noté par **Hadj Sadok (2008)** et **Boutakiout (2015)** dont les valeurs étaient égales à 4.62 et 4.7, respectivement. La variation du pH est due principalement à la différence des conditions climatiques et au processus de maturation (**Bezzala et al., 2005**). En plus, l'acidité augmente la nuit et diminue pendant la journée, où elle varie significativement en fonction de l'heure de la journée (**Inglese, 2018**).

Ce métabolisme acide des nopals génère les acides oxalique, malique, citrique et malonique (**Stintzing et Carle, 2005**). Selon **Sawaya et al. (1983)**, les acides organiques sont en général des intermédiaires des processus métaboliques, mais contrairement à l'abaissement qu'ils connaissent au cours de la maturation des fruits, ils ont une tendance à s'accroître durant la croissance des cladodes.

Par ailleurs, la conductivité électrique trouvée a été de $382\pm 2.01 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Ce paramètre est influencé par le pH de la solution, la valence des ions et le degré d'ionisation (**Rodier, 1997**). Les solides solubles ont été estimés à $4.80\pm 0.55 \text{ }^\circ\text{B}$, ce qui présente une teneur proche de celle incluse dans l'intervalle 5.1-11 $^\circ\text{B}$ rapporté par **Boutakiout (2015)**. Les solides solubles représentent l'ensemble des solides dissous dans l'eau, incluant les sucres, les sels, les protéines et les acides carboxyliques. Cette grandeur est influée par le climat, la nature du sol et le degré de maturation (**Messaid, 2008**).

III.1.3. Sucres, protéines et lipides

Les jeunes cladodes de l'*Opuntia* Algérien contiennent des teneurs faibles en protéines ($3.24\pm 0.49\%$), en lipides ($0.24\pm 0.01\%$) et en sucres totaux ($4.5\pm 0.22\%$), rapportées à la matière fraîche.

Cependant, le taux protéique de nos nopals égal à 26.57% par rapport à la matière sèche, est supérieur aux résultats d'**El Kharrassi, (2015)**, qui varient entre 4.64 et 14.22% pour les cladodes matures. La richesse en protéines est régie par la fertilisation azotée et l'âge des cladodes, à côté des différences significatives entre et au sein des espèces (**Stintzing et Carle, 2005, El Kharrassi, 2015**)

Contrairement à notre teneur de 36.91% MS, **Hadj Sadok et al. (2008)** ont obtenu un taux de sucres totaux de 1.66% MS pour le même stade de croissance (moins de trois mois), dans un temps où il peut atteindre 8.8%MS pour les cladodes âgés d'un an selon les mêmes auteurs. Cette variabilité marquée en sucres totaux s'interprète par l'augmentation de leur production durant le développement des cladodes, les conditions environnementales et la diversité inter-espèces (**Rodriguez-Felix et Cantwell, 1988; El Kharrassi, 2015**). Il est à noter aussi que le taux de sucre est soumis à des changements diurnes (**Stintzing et Carle, 2005**).

En outre, les analyses montrent que le contenu des jeunes cladodes en lipides atteint un pourcentage de $0.24\pm 0.01\%$ PF, soit l'équivalent de 1.96% MS, qui est largement supérieur à celui (0.2%) publié par **Angulo-Bejarano (2014)**, mais analogue à ceux (1 à 4% MS) rapportés par **Stintzing et Carle (2005)**. La granulométrie du sol, l'humidité atmosphérique, la nature du solvant et la méthode d'extraction utilisée sont les principaux paramètres d'influence sur la fraction lipidique des cladodes d'*Opuntia* (**Gaouar, 2011**).

III.1.4. Fibres brutes et pectines

En ce qui concerne les fibres brutes de ces nopals, l'analyse par la méthode de Weende montre qu'ils renferment de $9.14\pm 0.3\%$ MS, un taux assez conforme aux 5-20% MS rapportés par **Inglese et al. (2018)**. D'après **Ramulu et Rao (2003)**, la teneur en fibres est modulée par la localisation géographique et la constitution génétique, les conditions agro-climatiques, ainsi que la méthode de dosage utilisée.

En contrepartie, le contenu total en substances pectiques des nopals d'Algérie ($1.69\pm 0.06\%$ PF) considérées comme des fibres solubles, est quelque peu similaire à celui rapporté par **Boutakiout (2015)** pour les cladodes marocains (0.1 à 2.25% PF). Ce sont les

différentes conditions de culture, la période de récolte et le protocole d'extraction qui peuvent être à l'origine de cette différence dans le contenu pectique de ces nopals (**Amellal, 2008**).

III.1.5. Vitamine C

La proportion en vitamine C des nopals Algériens est de 7.04 ± 0.30 mg/100mL ou après conversion de 8.08 mg/100gPF. Ce niveau de vitamine C se situe dans la tranche de valeurs (7 à 22 mg/100g PF) rapportée par **Stintzing et Carle, (2005)** pour la vitamine C totale (les acides ascorbique et dehydroascorbique, et reste comparable aux valeurs données pour les fruits et les légumes de large consommation (**Hadj sadok, 2008**). **Le Houérou (1996)** confirme que la modification diurne de l'acidité des cladodes affecte leur taux de vitamine C dont la plus haute proportion a été notée quelques heures après le lever du soleil.

III.1.6. La chlorophylle

Dans ce travail la fraction chlorophyllienne a été évaluée à 0.322 ± 0.034 mg/100g PF pour la chlorophylle a et 0.131 ± 0.069 mg /100g PF pour la chlorophylle b, soit un total d'environ 0.45mg//100g PF qui se rapproche du taux maximal de chlorophylle (0.35-0.43 mg/100g PF) estimé par **Hadj Sadok (2008)**. La prédominance de la chlorophylle a sur la chlorophylle b dans les nopals Algériens observée dans ce travail a également été signalée par **Guevara-Figueroa et al. (2001)** dans les nopals de plusieurs autres variétés de figue de barbarie dans le monde. Il existe une relation directe entre l'augmentation du taux de chlorophylle des cladodes et l'intensification de la photosynthèse (synthèse de glucides) avec l'âge de celles-ci, ainsi qu'au début de la fructification (**Chernomorsky, 1999; Hadj Sadok, 2008**).

Il est clair, d'après les résultats trouvés, que la composition physicochimique et biochimique, ainsi que la valeur nutritionnelle des nopals ne peuvent être prises en aucun cas comme valeur absolue en raison de leur grande variabilité intrinsèque et extrinsèque. La variabilité génétique inter et intra-espèces se répercute phénotypiquement par une diversité morpho-physiologique des cladodes régissant de ce fait ses caractéristiques nutritives. Les exigences impliquées par la spécificité de l'âge est un autre exemple du contrôle interne de la qualité de cet aliment.

En contrepartie, la particularité des conditions édapho-climatiques abiotiques et des éléments biotiques accompagnant la croissance de l'*Opuntia* et ses cladodes, stimule ou entrave d'une manière contrastée leur métabolisme, et gère considérablement ses fonctions vitales. Le sol, le climat et la saison sont donnés comme des exemples pertinents par plusieurs chercheurs

pour ce cas de figure (**El Kharrassi, 2015; Paiva et al., 2016**). À leur tour, les procédures de récolte et de post-récolte s'avèrent d'une importance primordiale pour l'obtention et la préservation de la qualité des nopals.

La bonne connaissance et l'application sélective de ces facteurs rendent possible de cibler des propriétés spécifiques des nopals. Dans ce contexte, **Stintzing et Carle (2005)** ont proposé de choisir des cladodes à forte teneur en protéines et en fibres en les récoltant à un stade de croissance bien précis. De son côté, **Le Houérou (1996)** préconise la cueillette quelques heures après le lever du soleil afin de fournir les meilleurs cladodes à usage végétal ; turgescents, riches en sucres, en pro-vitamine A et en vitamine C. **Inglese et al. (2018)** insistent sur le fait que le moment optimal de récolte doit être choisi en fonction de la transformation qui va être appliquée.

Les technologies post-récolte sont aussi nécessaires pour maintenir la qualité d'un aliment acide si riche en eau comme le nopal. Sans ces pratiques, un tel aliment est sujet à dégradation microbologique rapide limitant sa commercialisation en produit frais, ainsi que son aptitude de transformation technologique et de conservation (**Stintzing et Carle, 2005**).

Les jeunes cladodes ou nopals d'*O. ficus indica* d'Algérie présentent une valeur nutritionnelle similaire aux légumes frais et feuilles de consommation quotidienne courante (**Hadj Sadok, 2008**). Le nopal est considéré comme un aliment hypocalorique par **Stintzing et Carle (2005)**, à cause de sa richesse en eau, en fibres alimentaires, en minéraux et vitamines qui lui confèrent uniquement 27 kcal/100g selon **Murillo-Amador et al. (2002)**. **Kamel et Kakuda (2008)** classent le nopal comme un aliment bon marché mais plus nutritif que le chou, les betteraves ou les bananes.

La sensibilisation du grand public Algérien au sujet de la valeur nutritive méconnue du nopal légume, ainsi que sur les effets bénéfiques attribués à sa consommation régulière, demeure déterminante dans l'enjeu de son utilisation culinaire locale. De leur côté, ses propriétés organoleptiques incluant la tendreté, la fraîcheur et le gout acide doux présentent un atout décisif au profit de son acceptation dans l'assiette du consommateur.

Par ailleurs, l'apport d'information sur les propres modes de préparation de ces nopals ; y compris le nettoyage des épines et glochides, la diminution de libération de mucilage durant la cuisson et l'amélioration d'attrait sensoriel des produits cuisinés, peut dynamiser le manque de consommation de nopals en Afrique du Nord (**Inglese, 2018**).

III.2. Microcomposition phytochimique des extraits de nopals

Les tableaux 4 et 5 rassemblent les résultats trouvés sur les principaux métabolites secondaires de nopals sans épines d'*O. ficus indica* Algérien. La comparaison des taux d'extractions a conduit vers le classement quantitatif décroissant suivant de ces métabolites : polyphénols > alcaloïdes > bétalaïnes > caroténoïdes.

Tableau 4: Distribution des principaux polyphénols dans les nopals inermes d'*O. ficus indica* d'Algérie.

Paramètre	Valeur
Rendement d'extraction (% MS)	5.02 ± 0.5
Polyphénols totaux (mg EAG/g MS)	63.54 ± 1.13
Flavonoïdes (mg EQ/g MS)	18.07 ± 0.77
Flavones et Flavonols (mg EQ/g MS)	12.20 ± 0.07
Tannins condensés (mg EAT/g MS)	0.18 ± 0.02
Tannins Hydrosolubles (mg EAT/g MS)	0.1 ± 0.03

MS: matière sèche; **EAG:** équivalent acide gallique; **EQ:** équivalent quercitine; **EAT:** équivalent acide tannique.

Tableau 5: Profil en bétalaïnes, alcaloïdes et caroténoïdes des nopals inermes d'*O. ficus indica* d'Algérie.

	Bétalaïnes		Alcaloïdes	Caroténoïdes
	Bétacyanines	Bétaxanthines		
Teneur (mg/100g MS)	25.64 ± 1.42	22.49 ± 0.78	596.60 ± 8.71	13.69 ± 1.72
	Total = 48.13 ± 2.2			
Rendement (%)	0.04		0.59	0.013

III.2.1. Polyphénols

III.2.1.1. Teneur des polyphénols totaux

Le rendement d'extraction des polyphénols des nopals Algériens inermes a atteint 5.02 ± 0.5% MS, soit légèrement supérieur à celui (4.6 ± 0.23%) enregistré par **Bari et al. (2012)**. La teneur totale en polyphénols de l'extrait de cladode a été estimée à 63.54 ± 1.13 mg EAG/g MS (tableau 4). Selon d'autres études, cette valeur s'étend de 1.7 mg/g PF à 180 mg EAG/g MS (**Gallegos-Infante et al., 2009; De Santiago et al., 2018**).

Si on admet que la synthèse et l'incorporation des polyphénols par les nopals d'*O. ficus indica* sont contrôlées par l'espèce végétale en question, son origine et son stade de croissance, outre les conditions environnantes qui l'entourent ; l'extrahibilité de ces métabolites secondaires d'intérêt va dépendre des procédures expérimentales adoptées (polarité du solvant utilisé et les caractéristiques de la méthode employée).

Dans la plante, l'accumulation de métabolites secondaires d'une manière générale et la teneur en polyphénols en particulier dépendent de facteurs biotiques et abiotiques (**Rochetti et al., 2018**). **Méndez et al. (2015)** ont confirmé la variation quantitative polyphénolique inter et intra espèces et variétales et ont montré que les cladodes d'*O. ficus indica* contiennent 8 fois de polyphénols que l'*O. dillenii*, alors que les cladodes de variété à fruit orange accumulent 25% de plus que la variété verte de l'espèce *O. ficus indica*. De plus, la domestication minimise le taux de polyphénols dans les cladodes qui se trouve divisé presque de moitié entre l'espèce la plus sauvage (56.8 mMole EAG/g) et la plus domestiquée (33.4 mMole EAG/g (**Astello Garcia et al., 2015**). L'influence de la partie botanique est démontré par **Mena et al. (2018)**, avec une supériorité respective de 7.2 et 9.2 mg/g MS pour les cladodes au détriment de la peau et la pulpe du fruit.

En ce qui concerne l'effet du stade de développement sur la présence des composés phénoliques, les jeunes cladodes présentaient une teneur plus élevée de 15.32-29.04% par rapport à leurs homologues plus âgés (**Ventura-Aguilar et al., 2017; Mena et al., 2018**). **González-Montero et al. (2009)** expliquent cette prédominance des polyphénols chez les cladodes jeunes et tendres par rapport à ceux en âge commercial, par la fonction de défense que les métabolites secondaires remplissent aux premiers stades de croissance, en substituts de moyens morphologiques comme les épines.

La zone d'échantillonnage impacte différemment la valeur des polyphénols totaux dans le cladode d'*O. ficus-indica*. Sur le plan quantitatif du contenu phénolique, le cladode d'Algérie (63.54mg EAG/g MS) est précédé par celui du Mexique (180mg EAG/g MS) et devance ceux d'Italie (26mg EAG/g MS) et d'Espagne (17mg EAG/g MS). Il semblerait que la sévérité graduelle du climat de ces régions influence le métabolisme des polyphénols (**Gallegos-Infante et al., 2009; Rochetti et al., 2018; De Santiago et al., 2018**).

Cependant, l'influence de la saison de récolte sur la teneur en polyphénols totaux dans les nopals reste quelque peu controversée. Selon **Alves et al. (2017)**, le contenu en polyphénols est dédoublé pendant la période pluvieuse par rapport à la période sèche (5.41 mg contre 2.85 mg

EAG/g MS) ; un résultat lié à la disponibilité d'eau. Cette hypothèse est contredite par **Boutakiout *et al.* (2015)**, qui ont trouvé que parmi les trois saisons testées (printemps, été et hiver), la période sèche (été) est celle qui coïncide avec une production accrue en polyphénols totaux comme réponse au stress hydrique. Les mécanismes qui régulent l'effet de saison sur la production des polyphénols ne sont pas complètement clairs et il existe une variabilité de réponses entre les espèces et les cultivars (**Alves *et al.*, 2017**).

Dans ce travail, la préparation d'une poudre fine par un séchage doux des nopals frais et un broyage prononcé évite la thermo-dégradation des polyphénols et offre une surface de contact plus importante facilitant la pénétration du solvant à la matrice végétale et la dissolution des molécules visées. L'efficacité d'extraction est significativement affectée par les procédés de préparation de matière végétale en l'occurrence le temps et la température de séchage ainsi que la granulométrie du broyat (**Chaalal *et al.*, 2012; Koné *et al.*, 2017**).

Le résultat de la technique d'extraction utilisée dans cette étude est en accord avec la constatation de **Benattia et Arrar (2018)**, qui révèlent que les teneurs les plus importantes en polyphénols et flavonoïdes ont été mentionnées pour l'extraction à froid (macération) sous agitation avec un mélange (éthanol/eau: 1V/1V) pendant 24h. Plusieurs recherches ont montré que la macération est le meilleur moyen pour extraire les polyphénols, où le rapport échantillon/solvant, le temps et la température d'extraction agissent directement sur le rendement d'extraction (**Chaalal *et al.*, 2012; Kechebar *et al.*, 2017; Koné *et al.*, 2017**).

III.2.1.2. Flavonoïdes totaux, flavones et flavonols

Dans les nopals Algériens (tableau 4), le contenu en flavonoïdes (18.07 ± 0.77 mg/g MS) excède le taux de 2.00 à 9.80 mg EQ/g MS rapporté par **Guevara-Figueroa *et al.* (2010)** pour les différents cultivars d'*Opuntia* spp. étudiés. Les flavonoïdes représentent la classe majeure des polyphénols dans les jeunes cladodes (28.43%) ; c'est ce qui ressort des résultats de **Mena *et al.* (2018)** et **Rochetti *et al.* (2018)**, qui montrent que cette classe est la classe polyphénolique dominante. Le niveau des flavones et flavonols extraits était 12.20 ± 0.07 mgEQ/g MS ; un résultat qui représente 4.22 fois celui (2.89 mgER/g MS) noté par **Gallegos-Infante *et al.* (2009)**. Il faut noter aussi que ces composés prédominent les autres sous-classes de flavonoïdes, puisqu'ils remplissent une part de 67.51% de la part flavonoïdique totale. **Rochetti *et al.* (2018)**, font le même constat pour les cladodes Italiens de la région de Ficodindia di San Cono PDO.

Comme pour les polyphénols, la teneur en flavonoïdes des cladodes du figuier de barbarie varie entre les cultivars, mais dépend surtout de la période de collecte car elle est fortement corrélée aux conditions environnantes (**Maataoui et al., 2006; Alves et al., 2017**).

Selon **Maataoui et al. (2006)** et **Alves et al. (2017)**, les méthodes d'extraction et de mesure des flavonoïdes ont aussi une répercussion très claire sur leur teneur dans les cladodes. Dans ce travail, la préparation de la poudre et l'élimination du solvant par rotavap sont considérées comme les étapes les plus délicates dans l'obtention des flavonoïdes, ce qui nous a poussé à les mener à moins de 40°C dans le but de préserver cette classe thermolabile. **Runha et al. (2001)** et **Guevara-Figueroa et al. (2010)**, ont rapporté que le processus de déshydratation tend à augmenter la dégradation des flavonoïdes, en s'argumentant que leur teneur dans les cladodes frais s'était amoindrie de 3 fois en poudre (de 9.80 à 3.1 mg EQ/g).

La valeur relativement faible de la teneur en flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux dans nos jeunes cladodes pourrait être liée à la période d'échantillonnage pluvieuse (novembre) impliquant moins de sécheresse, et par la suite moins de sollicitation de la production de ces molécules généralement synthétisées comme moyen de défense en cas de stress hydrique. Dans ce sens, **Alves et al. (2017)** ont attribué un niveau élevé en flavonoïdes à la période pluvieuse de collecte des cladodes, durant laquelle ils ont noté 0.90 à 3.43 mg EQ/g MS contre 1.53 à 3.02 mg EQ/g MS pour la période sèche. Dans la plante, les flavonoïdes ont une fonction protectrice vis-à-vis la génération des espèces réactives à l'oxygène (ERO) résultant du stress hydrique, en plus de leur rôle de maintien de la turgescence et la stabilisation des membranes et protéines cellulaires (**Abreu et Mazzafera, 2005; Rodziewicz et al., 2014**). Généralement, les flavonoïdes sont des composés environnementaux produits en réponse au stress environnemental (sécheresse, UV, stress hydrique, stress salin, basses températures, déficit nutritionnel en "N, K, P, S, Mg et Fe", haut niveau de CO₂) (**Sánchez-Rodríguez et al., 2012**).

III.2.1.3. Tannins condensés et tannins hydrolysables

Les tannins condensés et les tannins hydrolysables ont été évalués à 0.18±0.02 et 0.1±0.03 mg EAT/g MS (tableau 4). Dans le même ordre, ces valeurs étaient de 0.01 mg/mL dans le jus de cladodes (**Boutakiout et al., 2015**) et de 0.07mg/g PF dans les cladodes entiers (**Hadj Sadok et al., 2008**).

La présence des tannins dans les nopals révélée dans cette expérience a également été rapportée par les travaux d'**Alves et al. (2017)**. En plus, la prédominance des tannins condensés

au détriment des tannins hydrosolubles remarquée dans ce travail, a été aussi observée par **Boutakiout et al. (2015)** et **Chentli et al. (2015)**.

La faible proportion des tannins par rapport aux autres classes de polyphénols, est expliquée par le jeune âge de nos nopals, alors qu'ils vont gagner en quantité avec la croissance comme cela a été démontré par **Pérez-Torrero et al. (2017)**. En plus, leur localisation dans *l'Opuntia* est proportionnelle à l'organe en question où les hautes concentrations sont usuellement trouvées dans les fruits et les fleurs, tandis que les cladodes se trouvent en bas du classement (**Terrill et al., 1992; Frutos et al., 2002**)

La faible quantité de tannins dans les nopals analysés serait également liée à la période pluvieuse de collecte, sachant que leur production est stimulée par le stress climato-pédologique (sécheresse, sol, UV, prédation..) qui se trouverait probablement allégé durant cette période. D'autres auteurs (**Skadhauge et al., 1997; Chentli et al., 2015**) ont aussi remarqué cette dépendance, en plus de la différence accordée à la variation des espèces et variétés.

Cependant, la synthèse des tannins est écologiquement l'une des voies de défense contre des germes phyto-pathogènes (bactéries, champignons, virus) libres ou véhiculés par des nématodes, ainsi que contre des organismes prédateurs (insectes et herbivores) (**Collingborn et al., 2000; Waghorn, 2008; Hassanpour et al., 2011**).

III.2.2. Bétalaïnes

Le rendement d'extraction des bétalaïnes de nopals d'Algérie est faible (0.04%), reflétant cependant une teneur totale 48.13 ± 2.2 mg/100g MS (tableau 5). **De Wit et al. (2019)** ont également signalé la présence de bétalaïnes dans les cladodes d'*Opuntia* ssp, comme ils ont souligné la dépendance du niveau de ces pigments, qui varient de 5.4 à 77.4 mg/kg PF, aux cultivars. La prédominance des bétacyanines sur les indicaxanthines dans l'extrait de bétalaïnes des nopals d'Algérie trouvés ici, a également été observée par **De Wit et al. (2019)** pour les cladodes sud-africains.

Le rendement d'extraction des bétalaïnes est proportionnel non seulement aux cultivars, à la partie ou le tissu choisis et son stade de croissance, mais aussi à la technique d'extraction utilisée et à ses paramètres (**Cai et al., 1998; Sanchez-Gonzalez et al., 2013; Santos-Díaz et al., 2017; De Wit et al., 2019**). Selon ces chercheurs, ces facteurs provoquent même une distribution hétérogène des bétalaïnes et une variation des structures individuelles et des ratios bétacyanines/bétaxanthines dans les parties d'*Opuntia*.

Techniquement, **Castellanos-Santiago et Yahia (2008)** ont rapporté que l'extraction aqueuse conduit à des niveaux plus élevés de bétalaïnes et confère une meilleure stabilité à ces pigments. De même, la spectrophotométrie est la méthode la plus pratique et économique pour quantifier les bétalaïnes, malgré l'inconvénient de co-absorption par les substances non bétalaïniques qui cause une surestimation éventuelle de leur taux réel (**Belhaj sliman et al., 2016**).

III.2.3. Caroténoïdes

Les nopals d'Algérie contiennent 13.69 ± 1.72 mg de caroténoïdes par 100g de poids sec (tableau 5). Les chercheurs **Jaramillo-Flores et al. (2003)** et **Bensadón et al. (2010)** ont trouvé des quantités allant de 2 à 23.18 mg/100g MS, capables de s'élever avec le traitement thermique. En comparaison avec d'autres légumes et fruits, les cladodes d'*Opuntia* ont plus de caroténoïdes que les petites carottes, la betterave, les épinards et la laitue, alors que ce surplus peut atteindre entre 32 et 69 fois par rapport aux caroténoïdes de la pulpe des figues de barbarie (**MedinaTorres et al., 2011; De wit et al., 2019**).

A l'égard des variantes liées aux conditions du développement de la plante, la polarité des différentes classes de caroténoïdes (xanthophylles, carotènes, caroténoïde-esters) affecte le plus leur solubilité dans le solvant d'extraction et donc l'extraction elle-même (**Tsao et Deng, 2004; Dias et al., 2009**). Selon **Robards (2003)**, l'extraction des caroténoïdes par les solvants organiques est la technique la plus utilisée et la plus rentable. L'hexane est le meilleur solvant pour les caroténoïdes apolaires tandis que l'éthanol reste le meilleur choix dans le cas des caroténoïdes polaires (**Machmudah et Goto, 2013; Amorim-carrilho et al., 2014**).

III.2.1.4. Alcaloïdes

La présence d'alcaloïdes dans les cladodes des espèces d'*Opuntia* observée dans cette étude a également été mentionnée par **Bari et al. (2012)** et **Mendez et al. (2012)**. Selon **Shedbalkar et al. (2010)**, la production d'alcaloïdes est une caractéristique de la famille des cactacées.

Dans cette étude, le rendement d'extraction des alcaloïdes des nopals est de 0.59%, ce qui donne une teneur de 596.6 ± 8.71 mg/100 g MS, soit environ 0.6% (P/P) (tableau 5). Ce taux est 10 fois inférieur que celui rapporté pour les cladodes d'*O. dillenii* (5.4% : P/P), mais plus élevé que le taux noté pour les cladodes d'*O. polyacantha* (0.08% : P/P) (**Pooja et Vidyasagar, 2016; Abdulazeem et al., 2018**).

Le faible rendement d'extraction des alcaloïdes des cladodes a été interprété par **Yubin et al. (2014)** comme étant un problème de technologie traditionnelle de séparation et de purification. Selon **Cordell et al. (2001)**, les alcaloïdes sont généralement présents en faible quantité (souvent moins de 1%) dans les extraits bruts de plantes.

La gamme d'alcaloïdes extraits des plantes et leur contenu peuvent être fortement influencés par l'espèce, son origine et son climat de développement, en plus de la nature de la partie ou du tissu utilisé et de son stade de croissance (**Berkov et al., 2005; Iranbakhsh et al., 2006; Kempf et al., 2011; Ricard et al., 2012**).

En outre, les paramètres d'extraction ; notamment la polarité du solvant, la température, le temps, le volume de rinçage et le cycle d'extraction ont un impact fondamental sur le rendement d'extraction (**Ferrer et al., 2005; Jiang et al., 2006; Jayakumar et al., 2016**).

III.3. Profil chromatographique des extraits de nopals

III.3.1. Identification des polyphénols par HPLC

57 composés phénoliques ont été trouvés dans les jeunes nopals analysés, dont 9 ont été identifiés par comparaison à leurs standards analytiques respectifs (fig.8, tableau 6). Les acides phénoliques tels que les acides gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïc), caféïque (acide 3,4-dihydroxycinnamique) et syringique (acide 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoïc) sont notés présents dans ce travail, similairement aux résultats de **Guevara-Figueroa et al. (2010)** sur des cladodes Mexicains.

Les flavonols quercétine et kaempferol et l'anthocyane malvin sont aussi identifiés dans nos cladodes Algériens. **Rochetti et al. (2018)**, trouve des substances pareilles dans les cladodes d'*Opuntia* Italien. La rutine (flavonol), naringenine (flavanones) trouvés dans cette recherche, sont aussi cités par **Mena et al. (2018)** pour les jeunes cladodes d'Espagne. Les nopals analysés contiennent la catéchine, un flavanol synthétisé aussi par les nopals tunisiens d'après **Ben Saad et al. (2017)**.

Le nombre des pics non identifiés au-dessous et au-dessus de l'intervalle des étalons utilisés laisse penser à l'existence d'autres acides phénoliques présents habituellement dans la matrice végétale des nopals selon **Aruwa et al. (2018)**, à l'exemple de l'acide vanillique, ferulique, coumarique et salicylique.

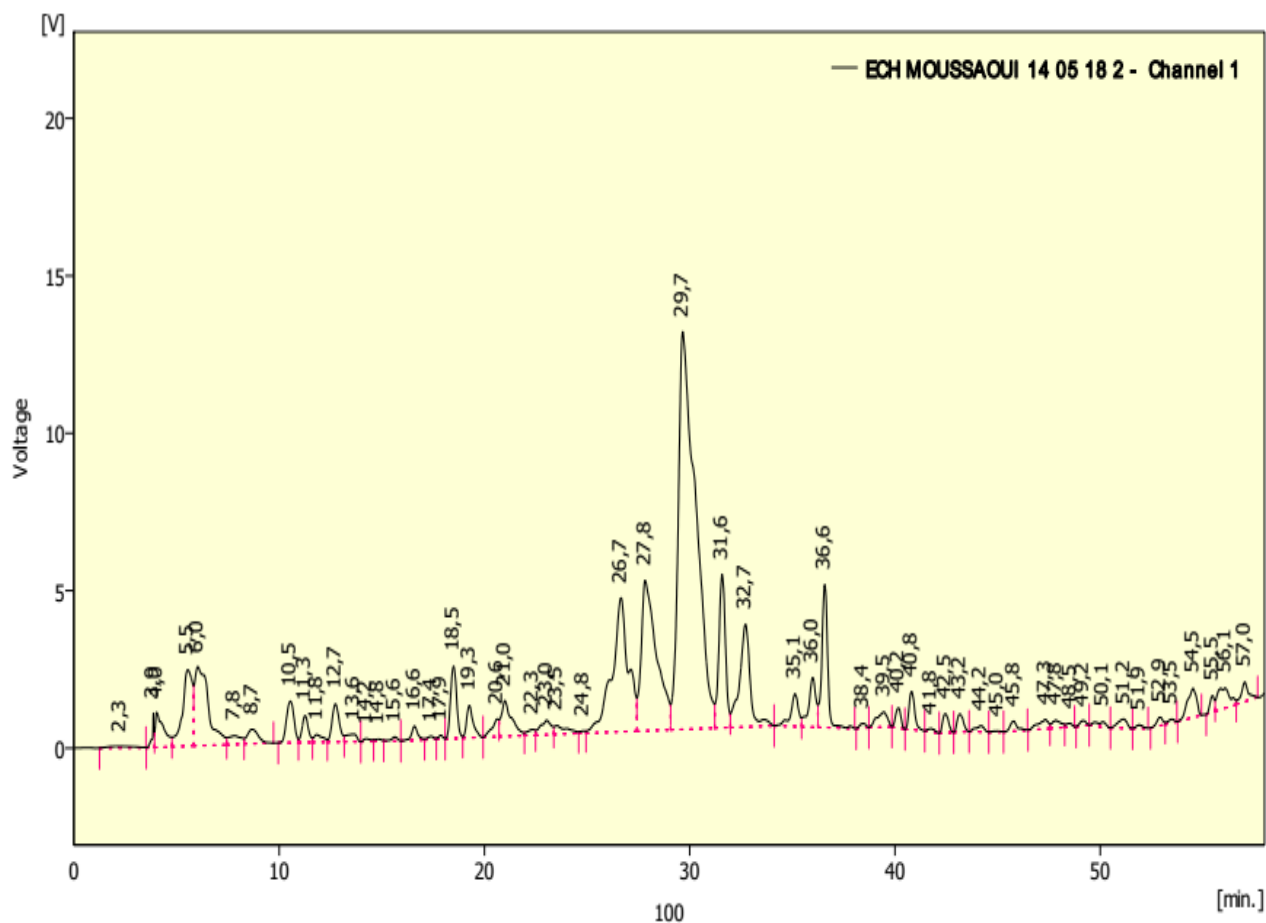


Figure 8: Chromatogramme des polyphénols de jeunes nopals d'*Opuntia* de Tissemsilt (Algérie).

Tableau 6: Profil chromatographique HPLC des composés phénoliques identifiés dans l'extrait de jeunes nopals de Tissemsilt (Algérie) par comparaison aux étalons.

Numéro de pic	Polyphénol	Rt (min)	Hauteur (mV)	Aire (%)
8	Acide gallique	10.3	13.129	1.4
17	Catéchine	17.5	17 0.999	0.1
22	Acide caféique	21.6	11.344	1.7
23	Acide syringique	22,6	1.786	0.2
30	Rutine	32.0	48.733	4.6
33	Malvin chloride	35.8	15.681	1.6
35	Quercétine	38.5	1.407	0.1
36	Naringenine	39.0	4.694	0.7
40	Kaempferol	42.2	5.999	0.5

RT: Temps de rétention

De même, les formes hétérosides du kaempferol et de l'isorhamnetin, à l'image de la nicotiflorin (Kaempferol-3-O-rutinoside) ou de la narcissin (Isorhamnetin-3-O-rutinoside), peuvent exister éventuellement dans les nopals Algériens (fig.8). D'après les recherches d'Astello-Garcia *et al.* (2015) et Msaddak *et al.* (2017), ils deviennent une caractéristique des cladodes d'*O. ficus indica*.

III.3.2. Identification des alcaloïdes par CG-MS

Dans cette étude, le chromatogramme CG-MS de différents composés présents dans l'extrait d'alcaloïdes des nopals d'*Opuntia* Algérien est présenté dans la figure 9. La nomenclature chimique des dix-sept alcaloïdes identifiés, leur formule, leur poids moléculaire et leur masse exacte sont présentés dans le tableau 7.

Les nopals de cette étude contenaient différentes classes d'alcaloïdes, y compris *des dérivés de l'Isoquinoline* ((2 (1H) -Isoquinolinecarboximidamide, 3,4-dihydro; nommée «débrisoquine»), la morphinan-4,5-epoxy-3,6-di-ol, 6- [7-nitrobenzofurazan-4-yl] amino), de *l'imidazole* (Decahydronaphtho [2,3-b] furan-2-one, 3 - [[2- (1H-imidazol-4-yl) ethylamino] methyl] -8a-methyl-5-methylene-), *d'imidapyrazole* (Pyrazole [4,5-b] imidazole, 1-formyl-3-ethyl-6-β-d-ribofuranosyl-) et de *pyrazolo-benzothiazole* (2-Benzothiazol-2-yl-4-cyclopentylaminomethylene-5-methyl-2,4-dihydro-pyrazol-3-one).

Différents alcaloïdes ont été également identifiés à l'issue de cette manipulation. Il s'agit *d'alcaloïdes de pyridine* (2,7-Diphenyl-1,6-dioxopyridazino [4,5: 2', 3'] pyrrolo [4 ', 5'-d] pyridazine; 3-Pyridinecarboxylic acid, 2,7 , 10-tris (acetyloxy) -1,1a, 2,3,4,6,7,10,11,11a-decahydro-1,1,3,6,9-pentamethyl-4-oxo-4a, 7a epoxy-5H-cyclopenta [a] cyclopropa [f] cycloundecen-11-yl ester,[1aR- (1aR *, 2R *, 3S *, 4aR *, 6S *, 7S *, 7aS *, 8E, 10R *, 11R *, 11aS *)] -), *d'alcaloïdes d'indole* (Aspidofractinin-3-ol, 17-methoxy-, (2α,5α)-; Glucobrassicin), *d'alcaloïdes de phényl* (2-Hexanone, (2,4-dinitrophenyl) hydrazine), (acide benzènepropanoïque α-[(2,4-dinitrophenyl) hydrazono]-4-hydroxy-, et cathine), *d'alcaloïdes stéroïdes* (17a-Methyl-3β-methoxy-17a-aza-D-homoandrost-5-ene-17-one; pseudosolasodine diacetate; Pregn-4-ene-3,20-dione, 17,21-dihydroxy-, bis(O-methyloxime)), *d'alcaloïdes lactone* (Neronin, 4β, 5-dihydro-) et *d'alcaloïdes pteridine* (Pterin-6-carboxylic acid).

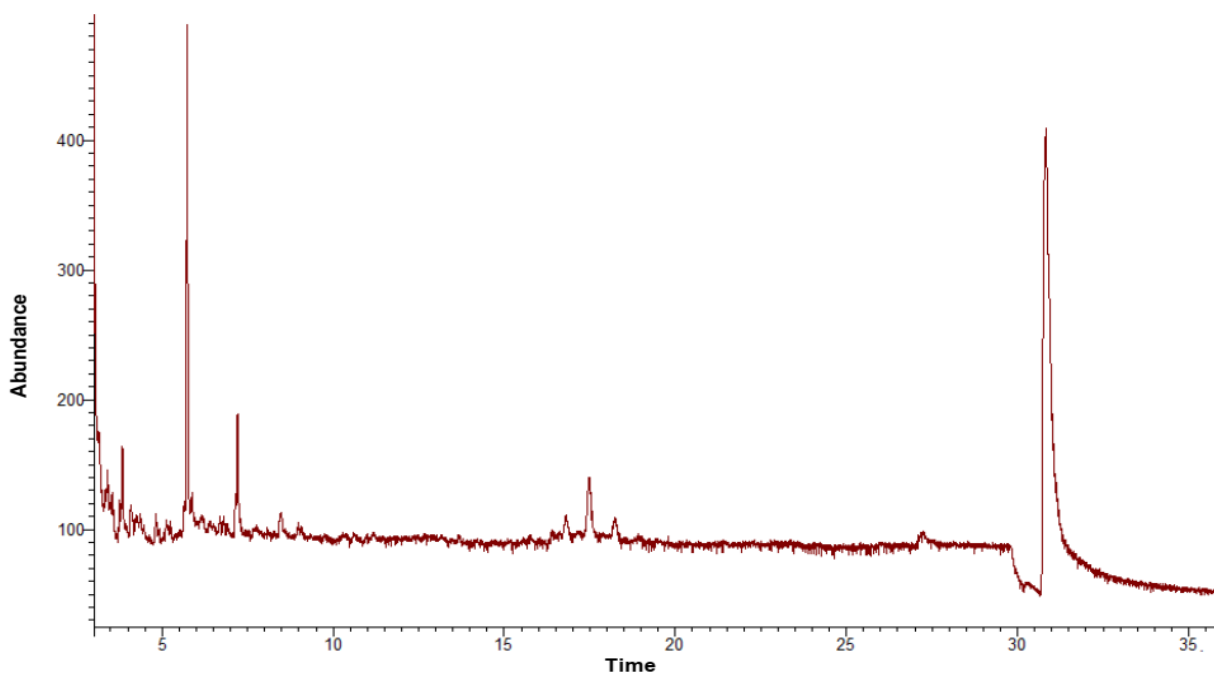


Figure 9: Chromatogramme des alcaloïdes de jeunes nopals d'*Opuntia* de Tissemsilt (Algérie).

Tableau 7: Profil chromatographique CG-MS des alcaloïdes identifiés dans l'extrait de nopals d'*Opuntia* de Tissemsilt-Algérie.

Name	R _t (min)	Formule	Masse exacte
Neronine, 4β,5-dihydro-	8.804	C ₁₈ H ₂₁ NO ₆	347.136887
2(1H)-Isoquinolinecarboximidamide, 3,4-dihydro-	8.936	C ₁₀ H ₁₃ N ₃	175.110948
Morphinan-4,5-epoxy-3,6-di-ol, 6-[7-nitrobenzofurazan-4-yl]amino-	9.027	C ₂₆ H ₂₇ N ₅ O ₆	505.196133
Decahydronaphtho[2,3-b]furan-2-one, 3-[[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]methyl]-8a-methyl-5-methylene-	9.159	C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₂	343.225977
2-Benzothiazol-2-yl-4-cyclopentylaminomethylene-5-methyl-2,4-dihydro-pyrazol-3-one	9.194	C ₁₇ H ₁₈ N ₄ OS	326.120132
17a-Methyl-3β-methoxy-17a-aza-D-homoandrost-5-ene-17-one	9.311	C ₂₁ H ₃₃ NO ₂	331.25113
3-Pyridinecarboxylic acid, 2,7,10-tris(acetyloxy)-1,1a,2,3,4,6,7,10,11,11a-decahydro-1,1,3,6,9-pentamethyl-4-oxo-4a,7a-epoxy-5H-cyclopenta[a]cyclopropano[f]cycloundecen-11-yl ester, [1aR-(1aR*,2R*,3S*,4aR*,6S*,7S*,7aS*,8E,10R*,11R*,1aS*)]-	9.422	C ₃₂ H ₃₉ NO ₁₀	597.257397

Glucobrassicin	9.499	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₉ S ₂	448.061022
Pyrazole[4,5-b]imidazole, 1-formyl-3-ethyl-6-β-d-ribofuranosyl-	9.676	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ O ₅	296.11207
2-Hexanone, (2,4-dinitrophenyl)hydrazone	9.39	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ O ₄	280.117155
Benzenepropanoic acid, α-[(2,4-dinitrophenyl)hydrazono]-4-hydroxy-	10.117	C ₁₅ H ₁₂ N ₄ O ₇	360.070599
Pseudosolasodine diacetate	10.428	C ₃₁ H ₄₉ N ₃ O ₄	499.36616
2,7-Diphenyl-1,6-dioxopyridazino[4,5:2',3']pyrrolo[4',5'-d]pyridazine	12.858	C ₂₀ H ₁₃ N ₅ O ₂	355.106924
Pregn-4-ene-3,20-dione, 17,21-dihydroxy-, bis(O-methyloxime)	12.949	C ₂₃ H ₃₆ N ₂ O ₄	404.267508
Aspidofractinin-3-ol, 17-methoxy-, (2α,5α)-	30.684	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₂	326.199429
Cathine	30.78	C ₉ H ₁₃ NO	151.099714
Pterin-6-carboxylic acid	31.42	C ₇ H ₅ N ₅ O ₃	207.039239

III.4. Propriétés biologiques des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes des nopals d'Algérie

III.4.1. Activité antioxydante

Le stress oxydatif a été clairement défini par Sies (2015), comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, entraînant une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et/ou des dommages moléculaires.

L'agression oxydante des constituants cellulaires endommage leurs macromolécules (les lipides, les protéines et l'ADN) structurellement et fonctionnellement, conduisant par conséquent, à des dommages liés à de nombreuses maladies chroniques et dégénératives comme le cancer, le diabète, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies cardiovasculaires, l'Alzheimer et le Parkinson (Pincemail *et al.*, 1999; Koechlin Ramonatxo, 2006; Uttara *et al.*, 2009).

Le regain d'intérêt pour les antioxydants, naturels particulièrement, n'est pas seulement dû à leur valeur biologique dont la nécessité est intensivement accrue, mais aussi à leur impact économique, car la plupart d'entre eux peuvent être extraits de sous-produits alimentaires et d'espèces végétales sous-exploitées (Lourenço *et al.*, 2019). Les nopals d'*Opuntia* d'Algérie qui font l'objet de cette étude, représentent un exemple idéal de ces sources d'antioxydants.

Afin d'avoir une connaissance aussi large et précise que possible du pouvoir antioxydant des extraits de nopals Algériens in vitro, des techniques différentes en principe et objectif ont été utilisées dans cette étude. Ces tests incluant le DPPH, le pouvoir réducteur (FRAP) et le blanchiment du β -carotène diffèrent dans les mécanismes et la cinétique de réaction (Alam *et al.*, 2013).

III.4.1.1. Piégeage du radical libre DPPH

La figure 10 montre que les polyphénols de nopals étaient les plus efficaces comme DPPH-piégeurs par rapport aux autres extraits et même vis-à-vis le standard positif. Avec une IC50 de l'ordre de 84.8 μ g/mL contre 102.99 μ g/mL pour l'acide ascorbique, ces biomolécules améliorent significativement ($p < 0.05$) l'activité anti-radicalaire d'un pourcentage de 17.66% (tableau 8).

Tableau 8: Capacité de piégeage du radical libre DPPH par les polyphénols, caroténoïdes, bétalaines et alcaloïdes des nopals exprimée en IC50

	DPPH (IC50 μ g/mL)
Acide ascorbique	102.99 ^b
Polyphénols	84.8 ^a
Caroténoïdes	115.31 ^b
Bétalaines	104.89 ^{ab}
Alcaloïdes	119.40 ^{ab}

Les différentes lettres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.

Lee *et al.* (2002), ont signalé une IC50 neuf fois plus basse pour l'extrait des cladodes Coréens, avec une inhibition complète du radical DPPH à 15 μ g/mL seulement. Contrairement à ces valeurs, les extraits des cladodes marocains testés par Toure *et al.* (2015), nécessitent une IC50 treize fois plus importante que la nôtre touchant la barre de 1208.75 ± 179.21 μ g/mL. L'effet de piégeage des polyphénols dans cette étude suit une allure concentration-dépendante, comme s'était rapporté par Toure *et al.* (2015) et Chintu *et al.* (2017).

Dans le présent travail, la capacité du piégeage du DPPH exercée par l'extrait de bétalaines de nopals a été estimée à une concentration inhibitrice 50 (IC50) = 104.89 μ g/mL, en deuxième rang après les polyphénols. Elle est dose-dépendante et similaire à celle de l'acide ascorbique à 1.84% près ($p > 0.05$). Belhadj Slimen *et al.* (2017) ont rapporté que l'activité du piégeage du DPPH par différents extraits bétalaïniques (CE50 allant de 3.35 à 8.35 μ M) est nettement plus élevée que celle des étalons connus tels que l'acide ascorbique (13.93 μ M) et l'acide férulique (19.35 μ M).

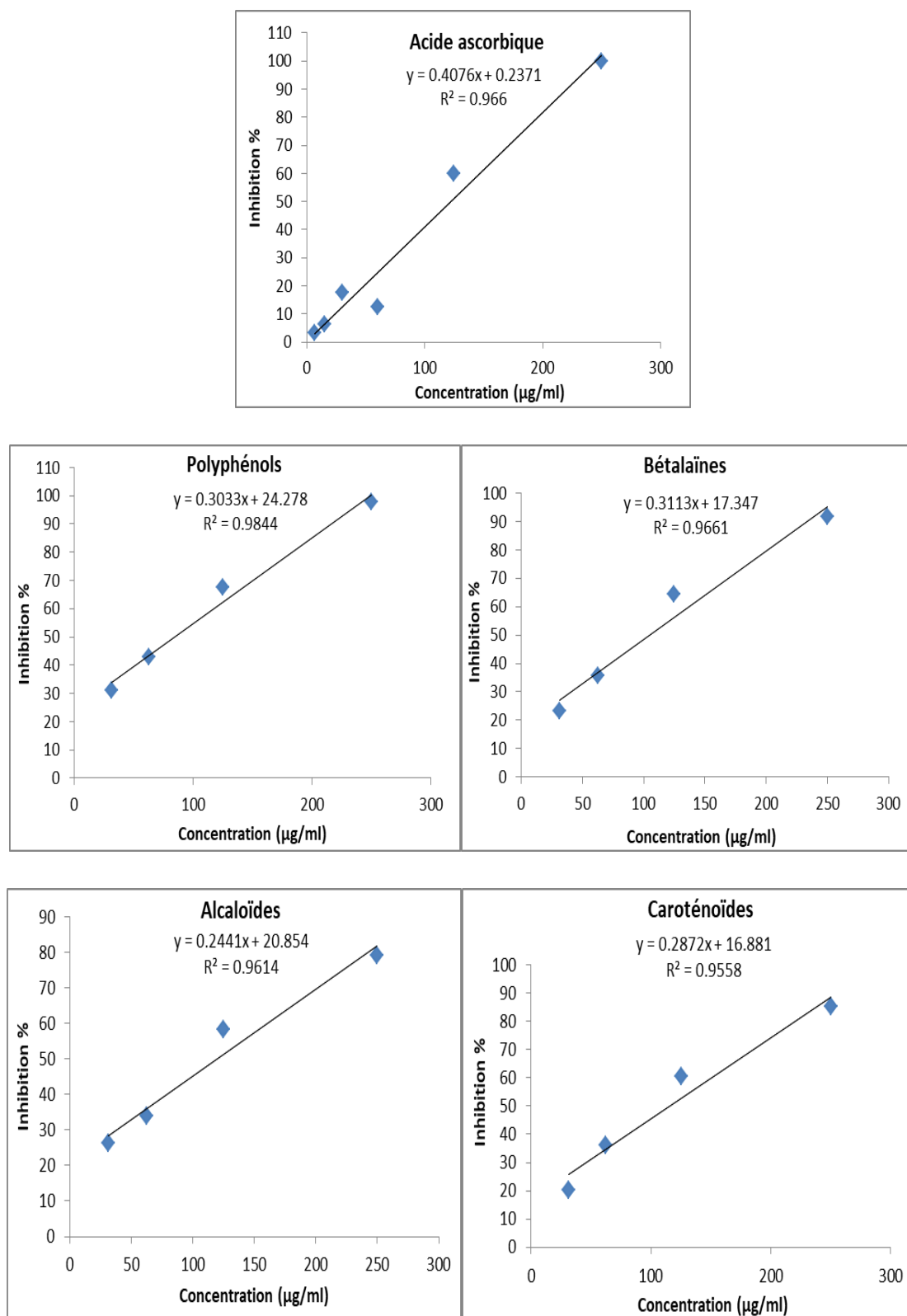


Figure 10: Capacité de piégeage du radical libre DPPH par les polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes de jeunes nopals de l'*Opuntia* d'Algérie, utilisés à différentes concentrations (31.25, 62.5, 125 et 250 µg/mL) et comparés à l'acide ascorbique comme standard positif (Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SD de trois mesures).

L'aptitude des caroténoïdes de nopals d'Algérie à neutraliser le radical libre DPPH observée dans cette étude atteint une IC₅₀ égale à 115.31 µg/mL. Classé en troisième position en matière d'efficacité anti-radicalaire, cet extrait est loin de 11.96% ($p > 0.05$) par rapport à l'acide ascorbique et a un effet dose-dépendant.

Leopoldo et al. (2012) attribuent l'activité antioxydante de l'extrait de nopals frais à l'augmentation de la concentration des caroténoïdes. **Jimenez-Escrig et al. (2000)** trouvent une activité anti-radical DPPH exprimée en mol caroténoïdes/mol DPPH qui variait de 0.16±0.01 (lycopène) à 3.29±0.31 (lutéine). Au contraire et d'une façon quelque peu isolée, **Müller et al. (2011)** ont attribué l'absence totale d'effet antiradicalaire des caroténoïdes contre le DPPH, même à des concentrations utilisées relativement élevées.

La neutralisation du radical libre DPPH par l'extrait d'alcaloïdes de cladodes est dose-dépendante tel que rapporté par **Jayakumar et al. (2016)**. L'activité antioxydante des alcaloïdes évaluée dans ce travail (IC₅₀ = 119.40 µg/mL), était de 15.93% ($p > 0.05$) plus faible que celle de l'acide ascorbique.

Le test DPPH est une méthode colorimétrique valide pour l'évaluation du potentiel antioxydant de composés spécifiques ou d'extraits de plantes (**Cheng et Moore, 2006**). La décoloration de la solution de DPPH par l'extrait révèle son pouvoir piègeur. De nombreuses études sur les cladodes du même cactus vont dans le même sens que celui de ce résultat (**Sanchez et al., 2014; Mabrouki et al., 2015**).

L'activité antioxydante observée pour les polyphénols des jeunes cladodes d'Algérie est non seulement liée à leur concentration, mais aussi à leur structure moléculaire. La connaissance des caractéristiques conformationnelles, électroniques et géométriques des systèmes phénoliques est d'une importance cruciale pour comprendre l'activité antioxydante. Il est communément admis que les principales caractéristiques structurelles d'une bonne activité anti-radicalaire sont l'apparition de plusieurs groupes OH sur le noyau aromatique ; en position ortho-dihydroxy notamment, la structure plane des phénols permettant la conjugaison et la délocalisation électronique ainsi que les effets de résonance, et finalement ; la présence de fonctions supplémentaires carbone-carbone ou groupe carbonyle (C=C et C=O) (**Leopoldini et al., 2011**).

Les polyphénols et plus spécialement la sous-classe des flavonoïdes, inactivent les radicaux libres selon deux mécanismes :

-le premier mécanisme est nommé transfert d'atomes d'hydrogène (hydrogen atom transfer: HAT), où l'antioxydant ArOH réagit avec le radical libre R en lui transférant un atome d'hydrogène, par rupture homolytique de la liaison O-H. Les produits de la réaction sont les espèces RH inoffensives et le radical ArO[•] oxydé (**Leopoldini et al., 2011**). Dans ce mécanisme, l'enthalpie de dissociation des liaisons (BDE) relative à la liaison O-H phénolique est un paramètre important dans l'évaluation de l'action antioxydante ; plus la valeur BDE est faible, plus la dissociation de la liaison phénolique O-H et la réaction avec les radicaux libres sont faciles (**Leopoldini et al., 2011**).

L'acide gallique, l'acide caféique, la catéchine et la quercétine identifiés dans les nopals d'Algérie, sont les systèmes scavengers les plus efficaces qui peuvent fonctionner par don d'atomes d'hydrogène. Ils affichent la fonctionnalité ortho-dihydroxy et ont des BDE très faibles par rapport au phénol de référence, car la radicalisation de leurs hydroxyles génère des espèces stabilisées principalement par des liaisons hydrogène intramoléculaires (**Leopoldini et al., 2011**). Le kaempferol est moins puissant comme donneur d'hydrogène suite à l'absence de la structure ortho-diphénolique au cycle B (**Leopoldini et al., 2011**).

-Le deuxième mécanisme appelé transfert mono-électronique (single electron transfer: SET), prévoit de donner un électron au radical R pour former l'anion R^{•-} énergétiquement stable avec un nombre pair d'électrons, et le radical cationique (ArOH^{•+}), considéré aussi comme une espèce radicalaire mais moins réactive (**Leopoldini et al., 2011**).

Dans le SET, le potentiel d'ionisation (IP) est le paramètre le plus important pour l'évaluation de l'activité de piégeage ; plus la valeur IP est faible, plus l'abstraction des électrons et la réaction avec les radicaux libres sont faciles (**Leopoldini et al., 2011**). Au sein du mécanisme de transfert d'électrons, les bons candidats trouvés dans l'extrait polyphénolique des jeunes nopals d'Algérie sont les composés qui présentent une conformation planaire et une large délocalisation électronique, de sorte que leurs valeurs IP sont inférieures à celle du phénol de référence, comme cela se produit dans le Kaempferol et la quercétine (**Leopoldini et al., 2011**).

Globalement, la plupart des polyphénols semblent piéger les radicaux libres par le mécanisme de transfert des atomes d'hydrogène, car des énergies plus élevées sont impliquées dans le processus de transfert d'électrons uniques (**Leopoldini et al., 2011**). Dans les deux cas, même si la réaction conduit à la formation d'autres radicaux ArOH^{•+} et ArO[•], ces derniers sont moins réactif vis-à-vis du radical R puisque leurs structures aromatiques dans lesquelles l'électron impair, issu des réactions avec le radical libre, a la possibilité de se propager sur toute

la molécule, entraînant une stabilisation radicalaire (**Leopoldini et al., 2011**). En plus, la stabilité de ces radicaux est renforcée par la possibilité d'établir des liaisons hydrogène internes entre l'atome d'oxygène radicalisé et l'hydroxyle vicinal (**Leopoldini et al., 2011**).

La disposition d'acides phénoliques et de flavonoïdes dans les nopals de la région de Tissemsilt (Algérie), argumentent leur pouvoir anti-radicalaire remarquable noté dans cette étude. L'acide gallique et l'acide caféique neutralisent les radicaux libres et réduisent leur production (**Khan et al., 2016; Kahkeshani et al., 2019**). Ainsi, les flavonols et les flavones ; qui représentent la fraction majeure des flavonoïdes dans l'extrait de polyphénols testé, se sont révélés très actifs d'après **Leopoldini et al. (2011)** en raison de la présence d'un groupe catéchol dans le cycle B. Ces auteurs signalent que les flavonols devancent les flavones en termes de puissance en raison de la présence du groupe 3-hydroxyle.

La cathéchine et la quercitine ainsi que leurs dérivés de méthylation, agissent comme des piègeurs de radicaux libres à un degré plus élevé que l' α -tocophérol (**Dueñas et al., 2010**). Le kaempferol et ses dérivés sont doués d'un potentiel antioxydant dû à leur capacité de piégeage des radicaux libres comme l'oxygène singlet, l'anion superoxyde et les radicaux hydroxyles (**Tatsimo et al., 2012**).

La quercétine est le meilleur antioxydant dans la classe des flavonols, avec une force anti-radicalaire qui résulte de la réunion des trois critères structuraux impliqués dans l'activité anti-oxydante des flavonoïdes ; en l'occurrence un cycle (A) avec des groupes 5,7-dihydroxyle, un cycle (B) avec 2 groupes hydroxyle (adjacents) et un cycle (C) avec 2,3-double liaison, 4-oxo et un groupe 3-hydroxyle (**Gupta et al., 2016; Vásquez-Espinal et al., 2019**). Il a été montré que ces produits d'oxydation ont une activité anti-radicalaire, évaluée par le test DPPH, plus importante que leur molécule mère (**Ramos et al. 2006**). Le même constat a été remarqué récemment dans les systèmes cellulaires (**Vásquez-Espinal et al., 2019**).

En plus de l'effet dose-dépendant des bétalaïnes envers le piégeage du radical DPPH cité aussi par **Yeddes et al. (2013)**, l'impact de la structure sur l'activité anti-radicalaire a également été confirmé par plusieurs chercheurs. **Gandía-Herrero et al. (2009)**, disent que l'activité antioxydante des bétalaïnes, notamment des bétaxanthines, est liée à une activité intrinsèque associée au système de résonance commun soutenu par les deux atomes d'azote de la bétaxanthine.

Néanmoins, la bioactivité intrinsèque de l'unité structurale de base des bétalaïnes appelée l'acide bétalamique, pourrait être améliorée par la connexion avec un noyau aromatique et la

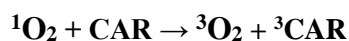
présence d'hydroxyles (**Gandía-Herrero et al., 2009; 2010; 2016**). À titre d'exemple, la bétanine moins hydroxylée que la bétanidine a une capacité amoindrie de piégeage des radicaux libres peroxy ($\text{ROO} \bullet$) et oxyde nitrique ($\text{NO} \bullet$) (**Miguel, 2018**).

Cependant, l'importance du pH sur l'activité de bétalaïnes a également été rapportée par **Gandía-Herrero et al. (2012)** qui suggèrent que l'acide bétalamique présente un pKa de 6.8 lié à sa capacité nucléophile indiquant l'existence d'un équilibre de déprotonation pertinent responsable d'une pH-dépendance de l'activité anti-radicalaire des bétalaïnes. De plus, l'acide bétalamique libre résultant de la rupture des bétalaïnes par oxydation, peut former des bétalaïnes de novo par condensation avec de la cyclo-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) ou des acides aminés (**Belhadj Slimen et al., 2017**).

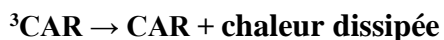
La comparaison de l'effet scavenger de radicaux par les représentants typiques des bétaxanthines et bétacyanines dans l'*Opuntia*: l'indicaxanthine et la bétanine, a montré une meilleure activité pour la bétanine (**Butera et al., 2002**). L'activité antioxydante des bétaxanthines dépend du nombre de groupes hydroxy et imino, alors qu'elle augmente par acylation et diminue par glycosylation pour les bétacyanines (**Belhadj Slimen et al., 2017**).

Les caroténoïdes identifiés dans les nopals analysés dans ce travail ; la lutéine, le β -carotène et l' α -cryptoxanthine agissent comme des antioxydants biologiques et protègent les cellules et les tissus contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS) (**Jaramillo-Flores et al. 2003; Mariutti et al., 2013**). Apparemment, la structure tétraterpène des caroténoïdes avec des groupes chimiques attachés à une série de doubles liaisons conjuguées est responsable de leur potentiel antioxydant in vitro et in vivo (**Mariutti et al., 2018**). L'activité antioxydante des caroténoïdes s'accroît avec le nombre de doubles liaisons dans la structure. C'est pourquoi, le β -carotène, la cryptoxanthine, la lutéine, le lycopène et la zéaxanthine qui possèdent plus de 11 doubles liaisons sont les antioxydants les plus efficaces du groupe des caroténoïdes (**Palace et al., 1999**).

Selon **Stahl et Sies (2003)**, les caroténoïdes sont spécialisés souvent dans le piégeage des radicaux peroxy et de l'oxygène moléculaire singulet ($^1\text{O}_2$), ainsi que dans la désactivation des sensibilisateurs excités engagés dans la génération de ce $^1\text{O}_2$. Le mécanisme adopté par ces phytopigments comprend à la fois une composante physique et une réaction chimique entre un caroténoïde et la molécule d'oxygène excitée (**Surai et al., 2001**). Selon **Surai et al. (2001)**, la voie principale est l'extinction physique qui implique le transfert de l'énergie des molécules à haute énergie, telles que $^1\text{O}_2$, vers le caroténoïde avec formation du caroténoïde triplet ^3CAR :



Dans la réaction suivante, le caroténoïde dissipe son énergie sous forme de chaleur et revient à l'état de base (Surai *et al.*, 2001):



De cette façon, les caroténoïdes restent intacts pendant l'extinction physique et peuvent être réutilisés plusieurs fois dans ces cycles (Stahl et Sies, 2003). L'extinction de 1000 molécules de ${}^1\text{O}_2$ par une seule molécule de β -carotène avant sa réaction chimique pour former des produits, en fait un exemple de cette résistance (Surai *et al.*, 2001)

Contrairement à nos résultats qui montrent qu'à partir des 4 extraits de nopals testés, les alcaloïdes étaient les moins efficaces en piégeage des radicaux libres, le travail de Du (2011), considère que ces métabolites représentaient la principale substance antioxydante en raison de leur corrélation positive évidente avec la capacité de piégeage du DPPH.

Il est vraisemblable que la structure des alcaloïdes des nopals d'Algérie presque dépourvus de groupes phénoliques libres sur leur squelette, et ne possédant qu'un nombre limité de groupes OH, est directement responsable de leur effet anti-radicalaire modéré. Dans ce sens, Afsar *et al.* (2016) confirment que l'activité de piégeage des alcaloïdes, résultant du don d'hydrogène à un radical libre, dépend de leur conformation structurelle et augmente avec le degré d'hydroxylation. Cette idée est affirmée par Ng *et al.* (2018), qui dévoilent dans leur étude que certains alcaloïdes sont des mauvais anti-radicalaires à cause de leur faiblesse en libération d'hydrogène.

Ainsi, les résultats de Račková *et al.* (2004) stipulent que le degré d'hydroxylation reste l'un des principaux paramètres d'influence de cet effet piégeant des alcaloïdes, dans lesquels les dihydroxylés (la magnoflorine) sont plus efficaces que ceux portant un groupe –OH non substitué (la jatrorrhizine), tandis que ceux caractérisés par l'absence du groupe portant l'hydrogène extractible (la berbérine) n'ont montré qu'une activité négligeable.

En outre, la présence d'un groupe phénolique libre sur le squelette d'alcaloïde s'est aussi avérée essentielle pour une bonne activité antioxydante intrinsèque selon Račková *et al.* (2004). On peut conclure que les groupes NH_2 , OCH_3 mais surtout OH existant quand même dans les structures des alcaloïdes identifiés, se sont comportés comme des donneurs d'hydrogène en faveur de la forme oxydée de DPPH, et restent derrière l'effet modéré noté ultérieurement.

III.4.1.2. Le pouvoir réducteur

Dans ce test, la présence d'antioxydants dans l'extrait de cladodes d'*Opuntia* réduit la forme ferrique du fer (complexe Fe^{3+} /ferricyanure) dans la solution jaune initiale, à la forme ferreuse (Fe^{2+}) qui change la solution en différentes nuances de vert et bleu (Bleu de Prusse de Perl), en fonction du pouvoir réducteur de chaque extrait (Amarowicz *et al.*, 2004). Ainsi, la réaction réductrice est évaluée en surveillant l'augmentation de la couleur bleue à 700 nm. Une absorbance plus élevée indique un pouvoir réducteur plus élevé, ce qui reflète une activité antioxydante plus haute (Jayaprakash *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002; Mabrouki *et al.*, 2015).

En comparant les pics des maximums d'absorption des différents extraits de nopals d'Algérie entre eux et par rapport à l'acide ascorbique (fig.11), nous avons trouvé que les bétalaïnes ont le plus d'influence sur la réduction du Fe^{3+} (DO=0.901± 0.065), suivis successivement des polyphénols (DO=0.843± 0.053), du standard positif (acide ascorbique) (DO=0.818± 0.02) et des caroténoïdes (DO=0.799±0.13). Les alcaloïdes affichent l'activité réductrice la plus faible (DO=0.222± 0.047).

La figure 11 montre que la capacité de réduction du Fe^{3+} (FRAP) a augmenté linéairement avec la concentration pour les quatre extraits ; ce qui traduit une proportionnalité entre la quantité de ces métabolites et la capacité de don des électrons. Cette approche de la dépendance à la concentration a été également mentionnée par Bari *et al.* (2012) et Toure *et al.* (2015) pour les extraits des cladodes d'*Opuntia*. En plus, Oyedapo *et al.* (2015), font remarquer que le pouvoir réducteur varie largement selon le solvant d'extraction

Le tableau 9 montre une différence statistique non significative ($p>0.05$) entre le standard positif et les extraits de nopals. L'extrait d'alcaloïdes est le plus faible réducteur comparé aux caroténoïdes, présentant la seule différence significative dans ce test ($p<0.05$).

Tableau 9: Pouvoir réducteur FRAP des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes des nopals exprimé en IC50

	FRAP (IC50 μ g/mL)
Acide ascorbique	143.46 ^{ab}
Polyphénols	143.47 ^{ab}
Caroténoïdes	106.13 ^a
Bétalaïnes	123.05 ^{ab}
Alcaloïdes	915.75 ^b

Les différentes lettres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.

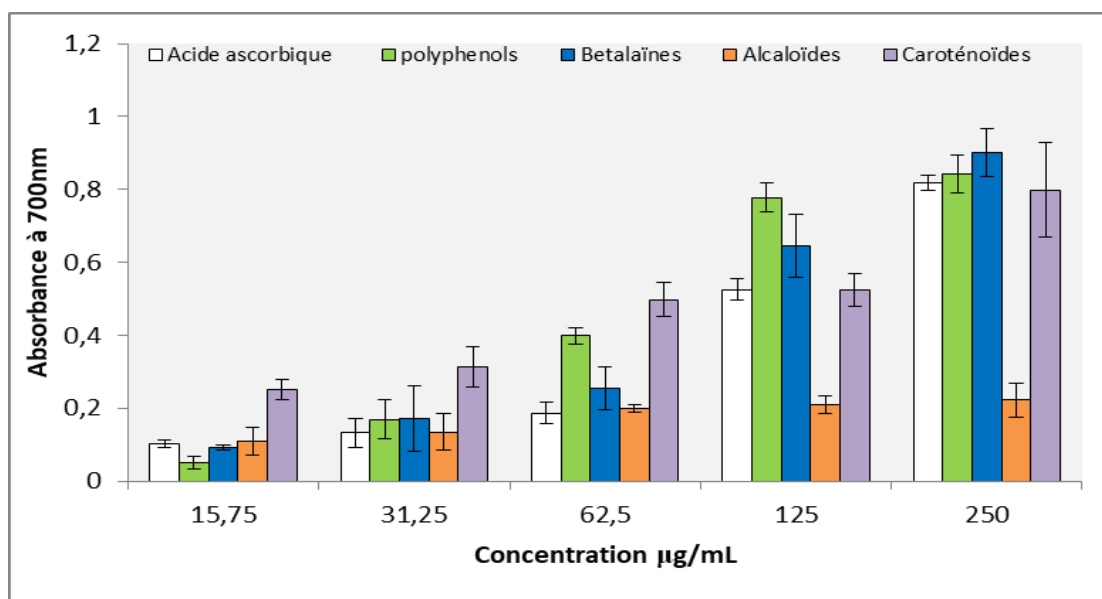


Figure 11 : Pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP) des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et des alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie, utilisés à différentes concentrations (15.75, 31.25, 62.5, 125 et 250 µg/mL) et comparés à l'acide ascorbique comme standard positif (Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures).

L'effet réducteur des caroténoïdes de nopals Algériens a été observé par **Han et al. (2012)** qui ont classé le lycopène comme l'agent réducteur le plus puissant et l'astaxanthine comme l'agent réducteur le plus faible. La propriété réductrice des caroténoïdes a également été démontrée par **Mortensen et Skibsted (1997)** qui ont noté que sous certaines conditions, le lycopène peut réduire l' α -, β -, δ - et γ -tocophérols oxydés par perte d'un électron.

Le pouvoir réducteur (FRAP) des bétalaïnes des jeunes nopals est analogue au résultat de **Zenteno-Ramírez et al. (2018)**, qui ont rapporté un coefficient de corrélation d'environ 0.9111 entre le niveau élevé de FRAP de jus de figue de barbarie (118.8 ± 16.3 mMeq FeSO₄/g de poids sec) et sa teneur en bétalaïnes. L'effet réducteur des polyphénols des cladodes a été aussi mesuré par **Toure et al. (2015)** pour l'*Opuntia* marocain, avec 120.90 ± 4.80 mg EAA/100g MS. Ce taux était 1638 mg EAG/kg PF pour les cladodes Italiens (**Rochetti et al., 2018**).

Dans ce test, le pouvoir réducteur limité des alcaloïdes de nopals de Tissemsilt reflète leur potentiel anti-radicalaire faible enregistré précédemment avec le test DPPH. La différence entre les alcaloïdes et l'acide ascorbique n'était significative ($p < 0.05$) qu'après la concentration de 125 µg/mL. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Gan et al. (2017)**, qui ont indiqué une corrélation significativement linéaire entre la teneur totale en alcaloïdes et la variation du FRAP. Cette corrélation a atteint $r^2 = 0.9773$ selon **Gülçin et al. (2010)** qui ont publié des résultats analogues. En outre, dans ce travail, les alcaloïdes étaient moins efficaces que les polyphénols

comme cela a été rapporté par **Maiza-Benabdesselam et al. (2007)**. Or, nos résultats sont en contradiction avec ceux de **Gülçin et al. (2010)** qui montrent que les alcaloïdes bisbenzylisoquinoline; la cépharanthine et la fangchinoline, ont une activité réductrice plus forte que les standards positifs pour des concentrations plus faibles que les nôtres (10-30 µg/mL).

Le pouvoir réducteur intéressant des caroténoïdes est sans doute structure dépendant. Il dépend principalement de la longueur de la chaîne des doubles liaisons conjuguées du caroténoïde, de la présence des cycles dans sa structure et de leur degré d'hydroxylation, d'époxylation ou de carbonylation. L'activité réductrice ferrique est principalement augmentée avec la taille du système de double liaison conjuguée (CDB). Les caroténoïdes acycliques (phytoène, phytofluène) à faible nombre de doubles liaisons (3 et 5, respectivement), n'ont aucune activité réductrice des ions ferriques. Cependant, pour le caroténoïde acyclique à 11 doubles liaisons appelé lycopène, le chevauchement orbital dans le chromophore est suffisamment important pour former un radical caroténoïde stable et, par conséquent, pour afficher une activité FRAP (**Mortensen et Skibsted, 1997**). Le travail de **Müller et al. (2011)** sur cinq caroténoïdes confirme cette vision, où seulement le lycopène a donné un effet réducteur positif représentant deux fois l'effet du standard α -tocophérol.

En contrepartie, la présence du cycle β -ionone des deux côtés du β -carotène et de l' α -carotène empêche ces caroténoïdes de réagir avec le complexe ferrique, malgré leur prédisposition d'un nombre important de doubles liaisons conjuguées (11 et 10 conjugated double bond ou CDB de suite). C'est suite à la perte de coplanarité de ces caroténoïdes cycliques, causée par l'entrave stérique entre le substituant CH₃ en C₅ et l'atome H en C₈ de la chaîne, que le chevauchement orbital est réduit et la contribution des doubles liaisons cycliques aux systèmes conjugués tend vers zéro (**Miller et al., 1996; Mortensen et Skibsted, 1997; Jimenez-Escrig et al., 2000**).

Cet obstacle stérique est surmonté par l'hydroxylation des cycles en position 3 (30) comme c'est le cas de la β -cryptoxanthine, la lutéine et la zéaxanthine. La fonction hydroxyle au voisinage du système conjugué de doubles liaisons (CDB) est indispensable pour l'activité FRAP des caroténoïdes contenant deux cycles β -ionone. Cependant, l'époxylation des hydroxyles de doubles liaisons cycliques remarqué chez l'anthéroxanthine, la néoxanthine et la violaxanthine, diminue linéairement leur pouvoir réducteur (**Müller et al., 2011**).

A son tour, l'insertion de groupes carbonyle à la position 4 (40) dans le cycle β -ionone conduit à une forte suppression de l'activité de réduction ferrique. Le caractère attracteur

d'électrons de l'oxygène carbonyle affecte la diminution de la valeur FRAP de ces céto-caroténoïdes (échinénone, canthaxanthine et astaxanthine) (Müller *et al.*, 2011). Finalement, la combinaison d'une chaîne acyclique et d'un cycle β -ionone hydroxylé dans la structure des caroténoïdes à l'exemple de la rubixanthine, conduit aux valeurs FRAP les plus élevées (Müller *et al.*, 2011).

Par ailleurs, nous expliquons le pouvoir réducteur remarquable de l'extrait de polyphénols de nopals Algériens, par la présence de bons composés qui fonctionnent à travers le deuxième mécanisme antioxydant, à savoir la quercétine et le kaempférol. Chez ces espèces, un transfert d'électrons important du flavonol vers le métal se produit, en particulier dans le cas des formes déprotonées (Leopoldini *et al.*, 2011).

Eu l'égard de leur aptitude de perdre des hydrogènes, les polyphénols de cladodes sont généralement considérés comme des réductones, qui rompent la chaîne des radicaux libres en faisant un don d'électrons, pour convertir les radicaux libres en produits plus stables (Gordon, 1990; Duh, 1998; Amarowicz *et al.*, 2004). Les travaux de Jayaprakasha *et al.* (2001) et de Toul *et al.* (2015), ont montré que les composés favanols, procyanidines et les tanins peuvent également agir comme des réductones pour neutraliser les oxydants. La cathéchine et la quercitine ainsi que leurs dérivés de méthylation sont des meilleurs réducteurs que l'alpha-tocophérol dans l'analyse FRAP (Dueñas *et al.*, 2010). Encore, certains dérivés de la rutine possèdent un pouvoir réducteur significatif (Jaganath *et al.*, 2009).

De leur côté, Siddhuraju et Becker (2007) expliquent cette capacité de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} par la présence de groupes hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir de donneur d'électrons. Contrairement à cette notion, les résultats de Leopoldini *et al.* (2011) montrent que dans le mécanisme du transfert d'électrons, les principaux facteurs affectant la valeur du potentiel d'ionisation IP sont la délocalisation et la conjugaison étendues des électrons π , renforcées par des phénomènes de résonances, plutôt que la présence de groupes fonctionnels particuliers tels que des hydroxyles supplémentaires. Une autre voie de réaction dans le don d'électrons est la réduction d'un antioxydant oxydé pour le régénérer sous sa forme réduite actif (Noumi *et al.*, 2011).

La capacité réductrice des bétalaïnes est étroitement liée à leur capacité de donation d'électrons variable en fonction de leur structure chimique, et déterminée via l'énergie de dissociation des liaisons et le potentiel d'ionisation de la molécule (Belhadj Slimen *et al.*, 2017). Structurellement, la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} a été attribuée à l'acide bétalaminique. L'acide

bétalamique, au système conjugué étendu dépendant du pH de l'environnement, peut réduire deux ions de Fe^{3+} à Fe^{2+} et est alors capable de donner deux électrons à un radical libre (**Gandía-Herrero et al., 2012**). De même, le faible potentiel de réduction de la bétanine et de l'indicaxanthine (0.4 et 0.6 V, respectivement) indique leur facilité de don d'électrons (**Butera et al., 2002**). Ces chercheurs ont montré que les espèces oxydées de ces deux pigments ne sont plus capables de recapturer les électrons, c'est-à-dire de devenir des oxydants.

La forte dépendance de l'activité réductrice des bétalaïnes au pH explique la dépendance de l'effet anti-radicalaire de ces pigments naturels de ce paramètre (**Gandía-Herrero et al., 2010**). Un équilibre de protonation fait des bétalaïnes de meilleurs donneurs d'électrons et des antioxydants plus actifs à des $pH > 6$ (**Gliszczynska- Świgło et al., 2006**). **Belhadj Slimen et al. (2017)** ont ainsi corrélé la capacité élevée des bétalaïnes dans la stabilisation des radicaux libres à la facilité remarquable de don d'électrons. Ils dénotent même l'avantage des bétacyanines vis-à-vis des bétacaxanthines en termes de potentiel de réduction.

Pour les alcaloïdes, la différence enregistrée entre nos résultats (915.75 $\mu\text{g/mL}$) et ceux (510.81 $\mu\text{g/mL}$) de **Prakasia et Nair (2016)** est justifiée par la structure moléculaire différente entre les classes d'alcaloïdes dans des échantillons différents. A cet égard, l'effet de la configuration structurelle est d'ailleurs indiqué dans l'étude de **NG et al. (2018)** pour lesquels, l'alcaloïde nommé mahanimbine a exercé le meilleur pouvoir réducteur FRAP à cause de la présence d'une densité électronique élevée dans la chaîne latérale de son unité isoprène. Celle-ci agit comme un bon donneur d'électrons pour purger les espèces radicalaires.

Selon **Khamtache-Abderrahim et al. (2016)**, cette capacité dépend également de la position et du nombre de groupes hydroxyle, ce qui éclaire en partie la faiblesse du pouvoir réducteur des alcaloïdes analysés dans ce travail, en tenant compte du nombre très restreint de ces groupes fonctionnels dans leurs structures. Le don modéré d'électrons par les alcaloïdes pourrait être aussi clarifié par l'antagonisme entre les groupes à faible potentiel d'ionisation comme CH_3 , OCH_3 et NH_2 , qui ont facilement perdu un seul électron, et les groupes à potentiel d'ionisation élevé, présents en concomitance dans la structure chimique (**Al-Sehemi et Irfan , 2017**).

III.4.1.3. Taux d'inhibition du blanchiment du β -carotène

La cinétique de blanchiment du β -carotène en présence et en absence des extraits de nopals et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) est illustrée par la figure 12. Les caroténoïdes inhibent de façon dose-dépendante de 49.64 à 68.26% le blanchiment du β -

carotène, soit un taux d'inhibition 5.22% plus élevé par rapport à celui du standard, l'acide ascorbique (63.04%) ; quoique cette supériorité de 5.22% n'était pas significative ($p < 0.05$). Les bétalaïnes et les polyphénols occupent la deuxième et troisième place avec des intervalles d'inhibition de l'ordre de 37.65%-64.88% et 29.90-49.22%, avec des écarts non significatifs ($p > 0.05$) par rapport au standard positif allant à 1.84% à 13.82%, respectivement.

Les alcaloïdes se trouvent les derniers en ordre comparés aux autres extraits avec un maximum d'inhibition de peroxydation lipidique qui n'excède pas les 25.24%. Ils sont significativement inefficaces ($p < 0.05$) comparés à l'acide ascorbique.

Des résultats similaires pour les bétalaïnes ont été obtenus par **Reddy et al. (2005)** qui ont signalé une inhibition de la peroxydation lipidique de 71% avec 100 $\mu\text{g/mL}$ de bétalaïne. De son côté, l'inhibition dose-dépendante du blanchiment de β -carotène par les polyphénols des cladodes a été rapportée par de nombreux travaux (**Bakari et al., 2017; Melgar et al., 2017**).

Outre l'extrait d'alcaloïdes à effet indépendant de la concentration, l'allure croissante d'inhibition de peroxydation de l'acide linoléique en réponse à l'addition de teneurs croissantes en extraits de nopals, nous a permis de tracer des droites de la fonction [inhibition% = f (Concentration)] pour chaque extrait, et d'en déduire les concentrations efficaces qui stoppent 50% d'oxydation lipidique (IC50) (tableau 10).

En comparant les trois extraits, les caroténoïdes et les bétalaïnes dépassent significativement les polyphénols. L'IC50 de notre extrait de polyphénols était de 257.31 $\mu\text{g/mL}$, une valeur semblable à celles citées par **Bakari et al. (2017)** qui s'étale de 135 à 317 $\mu\text{g/mL}$ pour la même partie et la même espèce végétale.

Tableau 10: Blanchiment du β -carotène exprimé en IC50 en présence des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes des nopals d'Algérie.

	Blanchiment du β -carotène (IC50 $\mu\text{g/mL}$)
Acide ascorbique	Nd
Polyphénols	257.31 ^b
Caroténoïdes	37.57 ^a
Bétalaïnes	68.49 ^a
Alcaloïdes	Nd

Les différentes lettres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%. nd: non définie

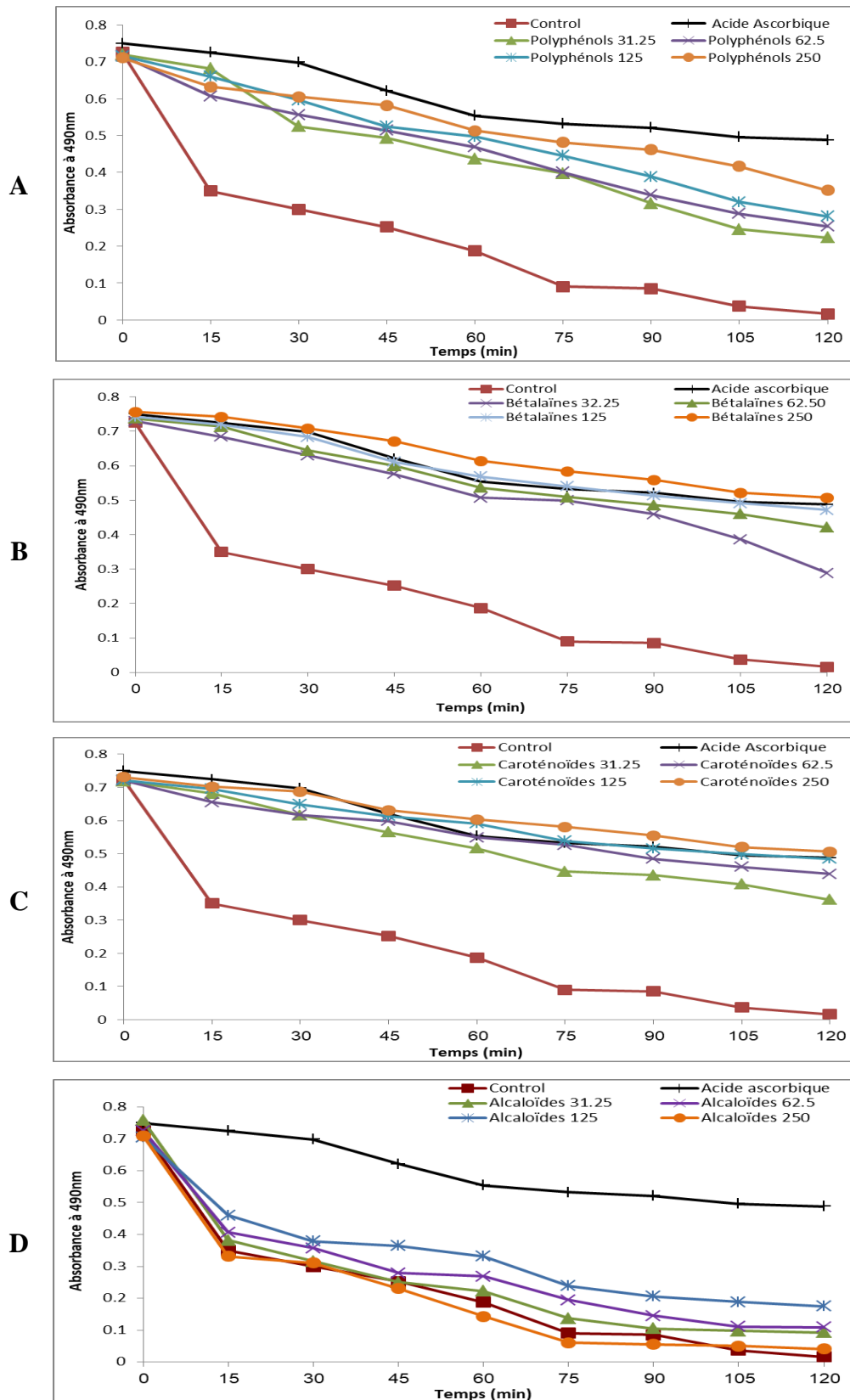


Figure 12: Cinétique de blanchiment du β -carotène en présence des A) polyphénols, B) caroténoïdes, C) bêtaïnes et D) alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie, utilisés à différentes concentrations (31.25, 62.5, 125 et 250 $\mu\text{g/mL}$) et comparés à l'acide ascorbique comme standard positif (Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures).

L'extrait d'alcaloïdes fait l'exception puisqu'il n'a affiché aucun effet dose -dépendant. On note une régression vers 5.64% pour la dose 250µg/mL après la marge d'accroissement 6.06-25.24%, enregistrée entre les concentrations 31.25 et 125 µg/mL. Dans leurs travaux, **Guo et al. (2019)** ont aussi observé le déclin très important pour les alcaloïdes et le contrôle négatif remarqué dans cette étude.

Le test de blanchiment du β-carotène semble être très utile comme modèle mimétique de peroxydation lipidique dans les membranes biologiques (**Ferreria et al., 2006**). Il exploite les radicaux peroxydes provenant de l'oxydation de l'acide linoléique, pour abstraire l'hydrogène du chromophore de β-carotène, et par conséquent, pour éteindre sa couleur orange caractéristique dont la décoloration peut être surveillée par spectrophotométrie. Cependant, la présence d'antioxydants diminue l'étendue de la destruction et du blanchiment du β-carotène, en neutralisant les radicaux libres de linoléate (**Alam et al., 2013; Dib et al., 2014**)

La protection de l'acide linoléique semble moduler par plusieurs facteurs, à savoir le solvant et les méthodes d'extraction, la concentration des antioxydants et leur nature liposoluble ou hydrosoluble (**Ammar et al., 2015**).

Rice-Evans et al. (1997) ont identifié la neutralisation de l'oxygène singulet (¹O₂) qui cause la peroxydation lipidique comme la voie d'intervention des caroténoïdes. Par ailleurs, les caroténoïdes réagissent le plus efficacement avec les radicaux peroxydes générés au cours de cette peroxydation lipidique (**Stahl et Sies, 2003**).

Contrairement aux antioxydants conventionnels, tel que le tocophérol qui piège les radicaux peroxyde (ROO·) en faisant un don d'un atome d'hydrogène, les caroténoïdes agissent par addition de ces peroxydes à n'importe quel endroit de la chaîne polyène conjuguée, entraînant de ce fait la formation d'un radical centré sur le carbone stabilisé par résonance (ROO-CAR). Comme ce radical est assez stable en raison de la délocalisation de l'électron non apparié dans le système polyène conjugué, il interfère avec l'étape de propagation et interrompt la séquence d'oxydation (**Krinsky et Johnson, 2005**)

Cette spécificité est liée à la longueur du système de double liaison conjuguée et à l'hydrophobicité des caroténoïdes (**Sies et Stahl, 1995; Krinsky et Johnson, 2005**). Au-delà, l'interaction entre les caroténoïdes et la matrice dans laquelle ils sont étudiés dicte leur effet (**Krinsky et Johnson, 2005**)

Chimiquement, les caroténoïdes contenant des groupes céto ou carbonyle en position 4 (40) dans le système cyclique β -ionone, en l'occurrence l'échinénone, la canthaxanthine et l'astaxanthine ; peuvent servir d'antioxydants plus efficaces dans le piégeage des radicaux ROO. À la suite d'une expansion de leurs systèmes polyène, ils présentaient une activité de piégeage des ROO environ 25% plus élevée que le β -carotène. En revanche, l'hydroxylation en position 3 (30) des caroténoïdes, comme dans la β -cryptoxanthine, la lutéine et la zéaxanthine, n'a pas entraîné de changement significatif de la valeur de piégeage des radicaux ROO par rapport au β -carotène en raison de la taille inchangée du système polyène (Müller *et al.*, 2011).

La combinaison d'un grand système de polyène hydrocarboné et des fonctions terminales attractrices d'électrons (COOH et COCH₃), conduit à des effets mésomères négatifs, réduit la densité électronique dans la chaîne conjuguée et augmente la réactivité pour ajouter des radicaux peroxyde. La crocétine, avec son système polyène de 9 CDB seulement, a présenté une valeur 25% plus élevée que le lycopène de 11 CDB, en raison des fonctions carboxyliques conjuguées des deux côtés de la molécule (Müller *et al.*, 2011). Selon Stahl *et al.* (1998), le lycopène est l'inhibiteur le plus puissant de la peroxydation lipidique in vitro.

En plus des caroténoïdes, l'arrêt de la peroxydation lipidique pour les autres extraits de nopals dépend étroitement de leur capacité de don d'hydrogène. Huang *et al.* (2005), considèrent que le test de blanchiment au β -carotène est basé sur le transfert d'atomes d'hydrogène. Contrairement à cet avis, Sundaram *et al.* (2015) insistent sur le fait que la peroxydation lipidique est mieux interrompue par les composés donneurs d'électrons, de sorte qu'ils agissent comme antioxydants primaires et secondaires.

À partir des résultats des tests DPPH et FRAP, et vu l'avantage des bétalaïnes comme puissants réducteurs dans le freinage de l'oxydation lipidique au détriment des polyphénols agissant par libération d'hydrogène, il est vraisemblable que l'effet de réduction est plus influençant que le don d'hydrogène sur ce phénomène. De la même manière, Belhadj Slimen *et al.* (2017) ont suggéré que la capacité des bétacyanines à inhiber la peroxydation de l'acide linoléique et l'oxydation des LDL est liée à leur efficacité antioxydante et anti-radicalaire. Cette dernière est la résultante du don électronique des bétalaïnes étudiées dans ce travail.

La limitation de la peroxydation lipidique par les bétalaïnes notée dans cette étude était analogue aux résultats de Tesoriere *et al.* (2003; 2004a; b), qui ont suggéré que de petites quantités de bétalaïnes, et malgré leur hydrophilicité, pourraient se lier aux lipoprotéines de basse densité (LDL) et augmenter leur résistance aux lésions d'oxydation in vitro et in vivo,

proportionnellement aux quantités incorporées. **Kanner et al., (2001)** et **Butera et al., (2002)** expliquent que le faible potentiel de réduction de certains bétalaines leur permet de réduire les radicaux lipoperoxyde et alcoxyde, et devenir des formes oxydées stables car incapables de recapturer des électrons pour redevenir oxydants.

Malgré leur potentiel de réduction réduit, l'indicaxanthine présentait une tendance plus élevée par rapport à la bétanine concernant la conservation des lipides dans tous les modèles d'oxydation (**Butera et al., 2002**). Ceci vise la différence émanant de la variation de structure, et conduit à prédire une atteinte plus facile de l'interface lipidique par l'indicaxanthine du fait d'une lipophilicité plus élevée, qui les qualifie selon **Butera et al. (2002)** comme composé avantageux dans les interactions avec les structures biologiques.

Dans le cas de polyphénols, la capacité d'inhiber la décoloration du β -carotène est attribuée aux flavonoïdes et aux tanins. La réponse antioxydante de ces composés à un substrat lipidique varie remarquablement en fonction de leur concentration, de leur structure chimique, de l'effet synergique ou antagoniste et des conditions d'oxydation (**Rice-Evans et al., 1997; Amarowicz et al., 2004; Siddhuraju et Becker, 2007; Subhashini et al., 2011; Dib et al., 2014**)

Tout de même, l'efficacité modérée des polyphénols est probablement attribuée à leur capacité de donner des électrons et des hydrogènes contrariée par leur polarité. **Ammar et al. (2015)**, voient que les électrons offerts par les groupes hydroxyles des composés phénoliques leur donne l'avantage d'empêcher la peroxydation de l'acide linoléique en piégeant les radicaux peroxydes, et suggèrent encore leur utilisation comme conservateurs antioxydants dans les systèmes émulsion. Les flavonoïdes ayant des substitutions 3',4',5'-hydroxy sur le cycle B sont d'excellents protecteurs contre la peroxydation lipidique, suivis par les di-hydroxy et 5-hydroxy, successivement.

Or, la présence du 7-hydroxyle en combinaison avec la double liaison 2,3 dans le rhamnetin-3-O-isorhamninoside, améliore son efficacité anti-peroxydante et lui confère le statut du plus puissant inhibiteur (**Ammar et al., 2009**). **Frankel et Meyer (2000)** ont, entre autre, proposé que les composés apolaires capables de se concentrer à l'interface lipide-eau sont plus efficaces dans la protection des lipides que les composés polaires dilués dans la phase aqueuse.

Des molécules phénoliques comme l'acide gallique, la quercétine et son dérivé la quercetin-3-O-glucuronide, ont tous exercé une inhibition de la peroxydation lipidique (**Del Rio et al., 2013; Gupta et al., 2016; Kahkeshani et al., 2019**).

La régression dans la protection des lipides contre la peroxydation en présence d'alcaloïdes peut indiquer une action pro-oxydante à fortes doses. Les conclusions de **Maiza-Benabdesselam et al. (2007)** et **NG et al. (2018)** adhèrent à cette hypothèse. Ils trouvent que les alcaloïdes neutralisent le radical hydroperoxyde et inhibent l'oxydation du β -carotène. Cependant, à des concentrations élevées, ils peuvent se transformer en transporteurs d'oxygène et agir comme pro-oxydants. Nous suggérons que l'absence d'effet contre la lipo-peroxydation de ces alcaloïdes est due au faible piégeage de radicaux et à la mauvaise capacité de don d'électrons qu'ils ont affiché dans les analyses précédentes, lesquelles sont en accord avec celles **d'Ammar et al. (2015)**.

III.4.2. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est la réponse naturelle du corps des mammifères à des agents hostiles comme les parasites, les micro-organismes pathogènes, les substances chimiques toxiques et les dommages physiques aux tissus. Le processus associé à la réponse inflammatoire est complexe mais plusieurs de ses aspects ont été exploités pour le criblage de composés anti-inflammatoires (**Kushagra et al., 2010**). La guérison actuelle de l'inflammation en utilisant des anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et non stéroïdiens (AINS) n'a pas été entièrement réussie et consiste à des effets secondaires inattendus. Par conséquent, le recours aux extraits de plantes en médecine traditionnelle pour trouver des composés anti-inflammatoires plus sûrs présente un besoin urgent (**Yoon et Baek, 2005; Lafuente et al., 2009**)

III.4.2.1. Pouvoir inhibiteur de la dénaturation de l'albumine bovine sérique

L'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) par les extraits de nopals *d'Opuntia* local et par le diclofénac de sodium, est illustrée par la figure 13. L'allure de cette inhibition est linéaire par rapport à la concentration pour toutes les substances testées à l'exception des alcaloïdes. L'anti-inflammatoire standard, le diclofenac de sodium, présente un effet positif qui atteint un maximum d'inhibition de la dénaturation de la BSA de $84.22 \pm 2.38\%$, significativement ($p < 0.05$) inférieur de 11.95 et 11.29% à ceux exercés par les polyphénols ($96.17 \pm 1.83\%$) et les bêtaïnes ($95.51 \pm 2.16\%$), respectivement. Les caroténoïdes des jeunes nopals inhibent à $88.5 \pm 1.65\%$ la dénaturation de la BSA, soit à un taux de 4.28% non significativement ($p > 0.05$) supérieur à celui du standard, le diclofenac de sodium.

Le niveau de protection de la BSA contre la dénaturation par les polyphénols de jeunes nopals *d'Opuntia* observée dans ce travail est analogue à celui obtenu par **Uttra et al. (2017)** avec un autre extrait de polyphénols (92.81%). L'effet dose-dépendant des bêtaïnes de nopals a

été signalé par **Winkler et al. (2005)** qui ont observé une inhibition dose-dépendante de la dégradation du tryptophane et la production de néoptérine (un biomarqueur de l'immunité cellulaire). Par ailleurs, le caractère dose-dépendant de l'effet protecteur de la BSA des extraits de caroténoïdes des jeunes nopals d'Algérie est similaire à celui rapporté par **Tian et al. (2009)**.

En revanche, les alcaloïdes de jeunes nopals d'Algérie inhibent cette dénaturation de la BSA à hauteur de $51.04 \pm 1.84\%$; soit un niveau inférieur de $(33.18\% \pm 0.54)$ à celui affiché par le standard, le diclofenac de sodium. Ce faible effet des alcaloïdes à protéger la BSA est non dose dépendant. **Vinchurkar et al. (2014)** ont lié l'effet anti-dénaturation des protéines à la présence d'alcaloïdes. **Tatti et al. (2012)** ont aussi montré une meilleure protection de la BSA à de faibles concentrations de métabolites secondaires.

Le processus de dénaturation des protéines implique leur changement conformationnel couplé à la perte de la structure tridimensionnelle et donc des fonctions. Il conduit à l'apparition de voies inflammatoires comme l'arthrite par la formation d'auto-antigènes in vivo (**Alam et al., 2015**). La prévention de ce phénomène constitue une propriété intéressante qui est très recherchée dans les médicaments anti-inflammatoires.

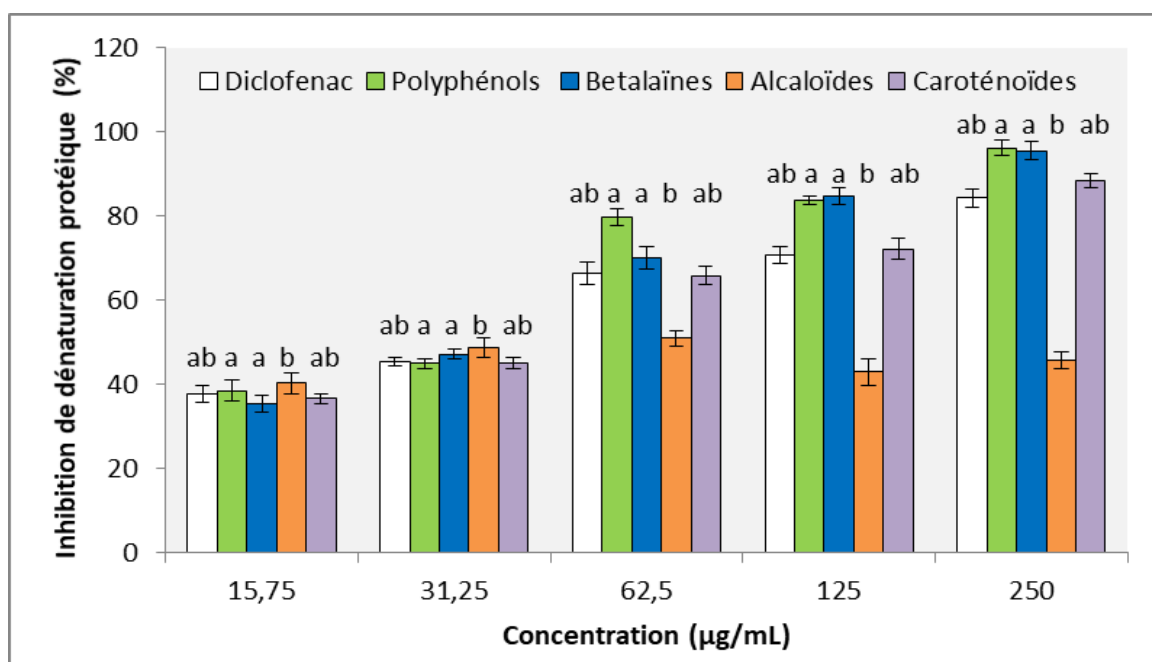


Figure 13 : Taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA) par différentes concentrations (15.75, 31.25, 62.5, 125 et 250 µg/mL) d'extraits de polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et d'alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie comparé aux mêmes concentrations de médicament standard, le diclofenac de sodium. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures, les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%).

Il est utile de noter que l'inhibition de la dénaturation des protéines mis en évidence dans cette étude pour la plupart des extraits de nopals d'Algérie, représente un autre mécanisme fonctionnel des anti-inflammatoires non stéroïdiens courants en plus de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines (**Sangeetha et al., 2011**).

Les flavonoïdes, les phénols et les tanins trouvés dans l'extrait de jeunes nopals d'Algérie lors du criblage phytochimique sont désignés en tant qu'effecteurs réels derrière l'effet protecteur de notre extrait de polyphénols. Ceci est également suggéré par **Verma et al. (2011)** et **Ghumre et al. (2017)**. Dans ce contexte, les résultats de **Matias et al. (2014)** ont montré que les flavonoïdes du fruit d'*Opuntia* de Portugal, à savoir les isorhamnetines et ses dérivés tels que l'isorhamnétine 3-O-rhamnose-rutinoside et l'isorhamnétine 3-O-rutinoside, et les acides phénoliques tels que l'acide férulique, piscidique et eucomique ; sont capables de contrer l'oxydation des protéines. Ceci laisse penser à un effet synergique de ces métabolites comme cela avait été suggéré par **Bailey-Shaw et al. (2017)**.

L'activité anti-inflammatoire des polyphénols de cladodes serait due à leur action antioxydante ou de piégeage de radicaux validée par les tests antioxydants antérieurs. L'inflammation et les dommages causés par les radicaux libres sont des processus interdépendants qui s'influencent mutuellement. La neutralisation et l'élimination de ces radicaux libres, considérés comme des médiateurs importants qui provoquent ou entretiennent des processus inflammatoires, peuvent par conséquent atténuer l'inflammation par des antioxydants et des piègeurs de radicaux (**Verma et al., 2011**).

Autrement, l'effet protecteur de la BSA par ces polyphénols est justifié par les travaux de **Williams et al. (2002)** qui prédisent la présence des sites d'interaction/liaison avec action anti-dénaturation sur la molécule de BSA, dont deux de ces sites se trouvent dans les régions riches en tyrosine aromatique et en résidus de thréonine et de lysine aliphatiques. Il a été rapporté que des molécules thérapeutiques telles que les polyphénols pourraient activer ce récepteur riche en motifs tyrosine en même temps que la thréonine, ce qui régule les voies biologiques de transduction du signal pour leur action biologique globale (**Rösner et al., 2001; Williams et al., 2002 ; 2008**). Ces auteurs ajoutent que des composés tels que les polyphénols, qui interagissent avec les régions aliphatiques autour du résidu de lysine sur la BSA, pourraient être intéressants comme antioxydants à activité anticancéreuse.

Compte tenu de leurs propriétés telles que l'hydrosolubilité, l'activité antioxydante et antiradicalaire, les bétalaines de nopals peuvent être qualifiés de stabilisants des liaisons BSA et

donc de structure contre les perturbations thermiques et les oxydants. La réaction inflammatoire étant dépendante de la déformation des protéines, elle peut être allégée par le contrôle du statut redox imposé par les bétalaines de nopals, en considérant la réciprocité d'effet existante entre l'oxydation et l'inflammation.

À propos des caroténoïdes, de nombreuses protéines importantes, y compris les protéines de réparation de l'ADN et les enzymes impliquées dans la récupération cellulaire, pourraient être protégées par ces métabolites dans les cellules (**Tian et al., 2009**). Les expériences de **Li et al. (2015)** ont révélé que le β -carotène ou l'astaxanthine peuvent probablement se fixer à la fois au site I et II de la BSA, mais le site I peut être le site de liaison principal. Il est vraisemblable qu'une fois cette liaison est établie, les caroténoïdes stabilisent la perturbation thermique des atomes de la BSA et affaiblissent la rupture des interactions intermoléculaires, comme les liaisons hydrogène.

Cependant, ces pigments sont responsables d'un changement de la structure spatiale de la BSA qui peut expliquer leur taux d'inhibition plus faible que celui des polyphénols et des bétalaines. Les travaux de **Zhang et al. (2012)** indiquent également que les caroténoïdes sont capables de changer la conformation de la BSA par réarrangement du réseau de liaisons hydrogène du polypeptide. Un autre argument en faveur de cette hypothèse est l'influence de ces caroténoïdes sur la diminution de la structure de l'hélice α et l'augmentation de la pelote aléatoire et du coude β observées pour la BSA, qui suggèrent un déploiement partiel de la protéine (**Li et al., 2015**).

L'effet protecteur des caroténoïdes de nopals contre la dénaturation est le plus souvent attribué à l'activité antioxydante de ces pigments liposolubles. Ceci est en accord avec la remarque de **James et al. (2013)** qui cite que les métabolites caroténoïdes actifs réduisent l'oxydation des protéines. D'après **Tian et al. (2009)**, c'est la capacité des caroténoïdes à piéger les radicaux libres qui est derrière leur effet protecteur des protéines.

Le niveau de dénaturation des protéines chez la bactérie *Deinococcus radiodurans*, incapable de synthétiser les caroténoïdes par mutation, a été analysé et comparé à celui de son type sauvage. Après le traitement des souches avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la teneur totale en carbonyles indicateurs de l'oxydation des protéines (mMole/mg protéine), était significativement plus élevée pour le mutant (0.0212) que pour le type sauvage (0.0169). Ce résultat suggère un effet anti-oxydation protéique pour les caroténoïdes synthétisés par cette bactérie (**Tian et al., 2009**).

Pour étudier l'effet des caroténoïdes de cette souche bactérienne sur l'oxydation des protéines, ces chercheurs ont mesuré les dommages oxydatifs de la BSA en leur présence et leur absence in vitro ; ils ont noté que la dénaturation de la BSA était inhibée par la déinoxanthine, le lycopène et la lutéine à hauteur de 45.1, 37.6 et 22.7%, respectivement ; ainsi que par le β -carotène à un taux de 50.3%. Ces niveaux-d'inhibition de la dénaturation de la BSA sont bien inférieurs à celui obtenu avec l'extrait de caroténoïdes de nopals d'Algérie analysés dans cette expérience. **Surai (2002)** avait préconisé que les caroténoïdes diffèrent dans leur capacité à prévenir les dommages oxydatifs des protéines en fonction de leur structure moléculaire.

La neutralisation médiocre des radicaux libres par les alcaloïdes peut atténuer moyennement le changement de l'état natif de la BSA, voire même la réponse inflammatoire. Par conséquent, l'effet pro-inflammatoire des alcaloïdes à des concentrations élevées peut s'expliquer par l'intensification de leurs groupes NO_2 , COCH_3 et COOH dans les milieux réactionnels, capables selon **Al-Sehemi et Irfan (2017)** d'attirer un électron au lieu de le perdre dans un acte pro-oxydant.

III.4.2.2. Stabilisation de la membrane des érythrocytes humains

Le test de stabilisation membranaire des érythrocytes humains consiste à incuber les extraits ou l'anti-inflammatoire de référence avec une suspension de globules rouges humains, traités avec une solution hypotonique à haute température. L'hémolyse est induite par l'accumulation excessive du liquide dans la cellule, ce qui aboutit à la rupture de la membrane thermiquement fragilisée et provoque la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant (**Rahman et al., 2015 ; Labu et al., 2015**).

L'effet protecteur des extraits de nopals d'*Opuntia* de Tissemsilt et du standard, le diclofenac de sodium, contre l'hémolyse induite des globules rouges est illustré par la figure 14. Les extraits de jeunes cladodes étaient plus efficaces que le diclofénac sodique.

L'extrait de caroténoïdes est le seul extrait qui diminue l'hémolyse significativement ($p < 0.05$) en mode dose-dépendant à hauteur de $88.4 \pm 1.68\%$ versus $48.97 \pm 2.73\%$ pour le diclofénac. L'effet anti-hémolyse des polyphénols et des bétalaïnes, utilisés à 250 mg/mL , surpasse positivement mais non significativement ($p > 0.05$) celui du diclofenac et atteint un maximum de stabilisation de l'ordre de $78.16 \pm 1.08\%$ et $66.79 \pm 1.09\%$, respectivement.

Contrairement aux autres biomolécules analysées, les alcaloïdes, utilisés à une concentration de $62.5 \text{ } \mu\text{g/mL}$, ont pu inhiber l'hémolyse de manière non dose-dépendante à

hauteur maximale de $52.38 \pm 2.01\%$. Ce taux d'inhibition chute à $27.21 \pm 1.45\%$ avec un extrait à $130 \mu\text{g/mL}$ d'alcaloïdes.

L'intensité de cet effet anti-hémolytique des différents extraits dans un ordre décroissant s'établit ainsi : caroténoïdes > polyphénols > bêtaïnes > alcaloïdes > diclofenac de sodium avec des différences respectives de 39.43%, 29.19%, 17.82% et 3.41%.

Lorsqu'il est mesuré par rapport à celui des autres extraits, l'effet du diclofénac est dose-dépendant ; ce qui est en accord avec les résultats des travaux de Ghumre *et al.* (2017). Cependant, d'autres auteurs trouvent que cette règle n'est pas respectée pour d'autres médicaments de référence comme le panadol ou l'ibuprofène (Oyedapo *et al.*, 2010; Ayinke *et al.*, 2015).

La réponse anti-hémolytique dose-dépendante illustrée par la figure 14 pour les trois extraits, a également été observée par Ghumre *et al.* (2017), qui ont constaté l'augmentation de la stabilisation membranaire en fonction de l'augmentation des concentrations des métabolites secondaires.

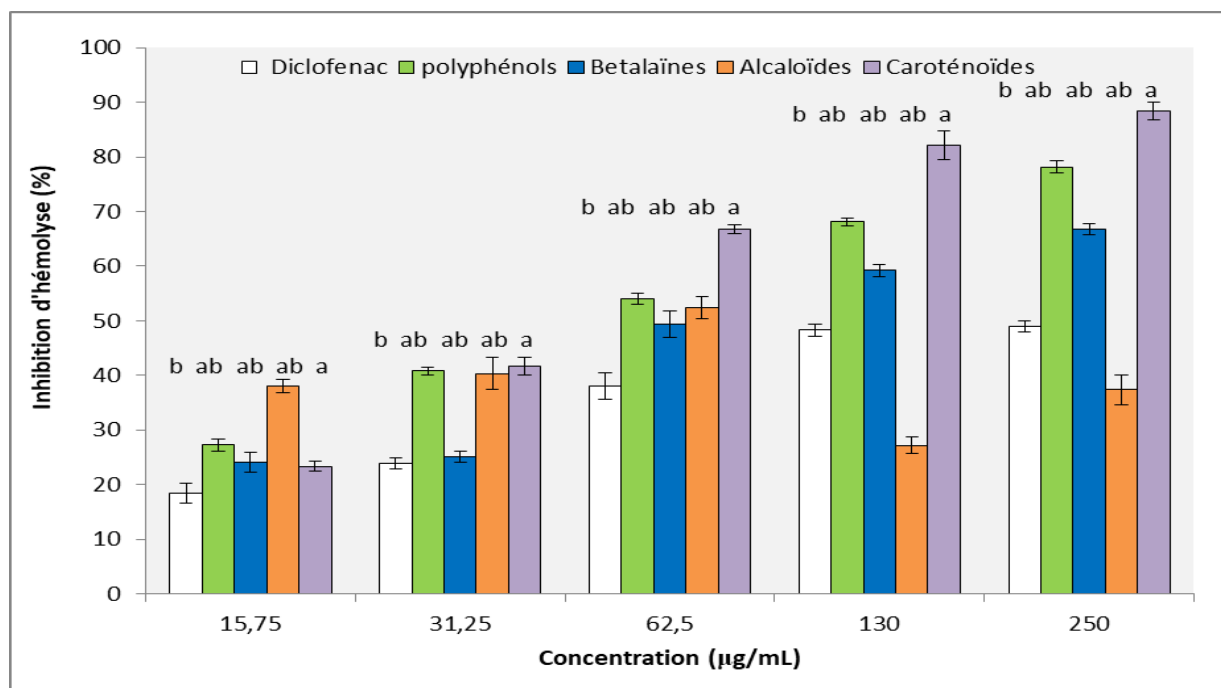


Figure 14: Inhibition de l'hémolyse érythrocytaire par stabilisation de la membrane en présence de différentes concentrations (15.75, 31.25, 62.5, 125 et 250 $\mu\text{g/mL}$) d'extraits de polyphénols, caroténoïdes, bêtaïnes et d'alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie comparés au médicament diclofénac comme anti-inflammatoire standard, le diclofenac de sodium, utilisé aux mêmes concentrations. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.

L'utilisation de la membrane érythrocytaire comme modèle est argumentée par leur ressemblance structurelle avec la membrane des lysosomes impliqués dans la réaction inflammatoire (**Hassan et al., 2015**). L'altération des membranes lysosomales libère leurs enzymes hydrolytiques dans le cytosol, conduit à la peroxydation lipidique et à la production d'espèces oxydantes, comme elle active les protéines responsables de l'inflammation qui endommagent les organites et les tissus voisins (**Oyedapo et al., 2015; Reshma et al., 2014**).

Ainsi, la stabilisation des membranes des globules rouges suggère que ces extraits ont la capacité de stabiliser les membranes lysosomales et d'inhiber la libération de leurs constituants pour limiter la réponse inflammatoire. Ce mécanisme est le mode d'action de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens et de préparations à base de plantes (**Dragan et al., 2016**).

La supériorité des caroténoïdes de nopals dans l'inhibition de l'hémolyse est liée à leur lipophilicité qui facilite leur accumulation et interaction dans les compartiments lipidiques comme les membranes. **Chew et al. (1991)** montrent qu'au sein des cellules, les caroténoïdes sont affiliés à différents types de membranes, comme la membrane cellulaire externe, mais aussi les mitochondries et le noyau, alors que leur présence libre dans le cytosol est plutôt faible. Le rôle filtre des caroténoïdes contre le fluide entourant la cellule est aussi cité par **Tian et al. (2009)**, qui ont noté que la présence de ces pigments dans la membrane de la bactérie *Deinococcus radiodurans* participe à leur adaptation aux environnements hypersalins en agissant comme une barrière contre l'eau et en permettant aux ions et aux molécules d'oxygène de pénétrer à travers la membrane cellulaire.

Il a été établi que la réactivité chimique d'un caroténoïde n'est pas le seul facteur qui détermine sa capacité à protéger les membranes. La position et l'orientation dans la bicouche lipidique membranaire, régie par la structure du caroténoïde, ont un effet significatif également important (**Britton, 1995; Woodall et al., 1997**). Les xanthophylles «la lutéine, zéaxanthine et β -cryptoxanthine» avec leurs groupes terminaux polaires, sont moins hydrophobes que les carotènes et se situent à l'interface lipide/eau, où ils agissent plus efficacement contre l'oxydation initiée dans les phases aqueuse et lipidique (**Surai et al., 2001; Bouayed et Bohn, 2012**). Les xanthophylles interviennent sur la largeur de la bicouche membranaire, et offrent une protection aux protéines membranaires (exemple: les glycoprotéines) (**Britton, 1995; Rice-Evans et al., 1997; Surai, 2002**).

Les carotènes ayant une structure d'hydrocarbure, y compris le β -carotène et le lycopène, sont profondément enchâssés dans le noyau interne hydrophobe. Puisqu'ils ne sont pas en mesure

d'intercepter facilement les radicaux libres provenant de la phase aqueuse et ne captent que ceux de la phase lipidique, les carotènes ne sont pas aussi enclins à inhiber l'oxydation comme les xanthophylles et ils ne protègent que les protéines allouées dans le noyau interne de la membrane (**Britton, 1995; Surai et al., 2001; Surai, 2002; El-Agamey et McGarvey, 2008**). Dans l'expérience de **Stahl et al. (1998)**, les mélanges de caroténoïdes étaient plus efficaces que les composés uniques et l'effet synergique était plus prononcé lorsque le lycopène ou la lutéine étaient présents.

Selon **Tarahovsky et al. (2014)**, les flavonoïdes peuvent interagir avec la tête polaire des phospholipides à l'interface eau-lipide, entraînant une rigidité de la membrane, une réduction de la fluidité et une amélioration de la stabilité mécanique des bicouches lipidiques. Les tanins possèdent la capacité de se lier aux cations, stabilisant ainsi les membranes érythrocytaires et d'autres macromolécules biologiques (**Oyedapo et al., 2010**).

Le mode d'action des molécules biologiques comme les polyphénols, pourrait être lié à l'attachement aux membranes érythrocytaires avec altération ultérieure des charges superficielles, pour empêcher l'interaction physique avec les agents d'agrégation ou favoriser la dispersion par répulsion mutuelle des charges similaires impliquées dans l'hémolyse des globules rouges (**Oyedapo et al., 2010**).

L'incorporation des bétalaïnes aux HRBC a été liée par **Tesoriere et al. (2005)** à la résistance des érythrocytes à l'hémolyse. Les activités immunosuppressives et anti-inflammatoires des bétalaïnes ont également été confirmées par **Gandía Herrero et al. (2016)**. Sous un autre angle, la réaction anti-hémolytique des bétalaïnes est expliquée par deux modes d'intervention ; le mode interne qui implique une fonction osmolytique des bétalaïnes incorporées stabilisant l'intégrité des cellules à l'état de gonflement ; dans lequel l'efflux de bétalaïnes, décrit comme osmolytes par **Sanjay et al. (2013)**, transporte l'eau avec lui et rétablit le volume normal des cellules. Le mode externe implique la liaison aux membranes cellulaires et le maintien de leur structure et de leurs fonctions, par exemple du repliement protéique des transporteurs et donc de leur capacité de transport, à côté de la préservation de l'intégrité des phospholipides agissant même sur la flexibilité et la résistance de la membrane (**Oyedapo et al., 2015; Umapathy et al., 2010**).

Malgré le fait que plusieurs études ont montré que les alcaloïdes possèderaient des propriétés anti-inflammatoires, les informations concernant leur effet sur les membranes sont encore très limitées. Les observations faites précédemment sur l'effet pro-oxydant et déstabilisant

des protéines attribué aux alcaloïdes à fortes doses, est incontestablement confirmé et répété dans ce test, qui laisse à prévoir une action pro-inflammatoire directe de ce métabolite à ces concentrations.

Nos résultats précédents sur l'aptitude anti-radicalaire et anti-oxydante des extraits de nopals, jumelée à leur capacité de stabilisation des protéines et protection des lipides, les candidatent comme des effecteurs réels dans le maintien de l'intégrité de ces éléments constitutifs de la membrane, à savoir leur plasticité et fonctionnalité. Cette interprétation corrobore avec la proposition d'**Umapathy et al. (2010)** qui stipule que l'interaction des extraits avec les protéines membranaires largement responsables des propriétés physiques de la membrane cellulaire, et constituent les canaux ioniques de celle-ci, contribuent à la régulation du volume et de la teneur en eau des cellules grâce au contrôle du mouvement des ions sodium et potassium.

En ce qui concerne l'impact des extraits sur les lipides membranaires, il a été rapporté qu'en raison de leur lipophilicité et de leur propriété spécifique de piéger les radicaux peroxyde, les caroténoïdes joueraient un rôle important dans la protection des membranes cellulaires et des lipoprotéines contre les dommages oxydatifs (**Sies et Stahl, 1995**). **Surai et al. (2001)** les considèrent comme faisant partie intégrante des systèmes antioxydants opérant à l'intérieur des membranes dans les systèmes biologiques.

Les principes actifs polyphénoliques maintiennent ainsi l'intégrité membranaire en agissant sur la distribution asymétrique des phospholipides par chélation des métaux de transition tels que le cuivre et le fer (**Chaudhuri et al., 2007; Mladěnka et al., 2011**). La quercétine et la quercétine-3-O-glucuronide ont présenté une affinité faible, mais significative, pour les membranes des bicouches phospholipidiques, et pourrait donc être capable d'agir comme des antioxydants efficaces pour les protéger (**Del Rio et al., 2013**).

De même, l'effet anti-hémolytique des bêtaïnes enregistré dans la présente expérience a également été noté dans de nombreux travaux cités dans l'étude **d'Azeredo (2009)**, où leur action protectrice des globules rouges était liée à l'inhibition de la peroxydation lipidique et de la décomposition de l'hème. Ces pigments bêtaïnes sont considérés comme des molécules cationisées présentant une affinité pour les fragments membranaires, auxquelles ils fournissent la fonction de piégeage des radicaux centrés sur l'oxygène (**Kanner et al., 2001, Butera et al., 2002**). Les alcaloïdes récupèrent aussi les radicaux libres responsables de la peroxydation des lipides membranaires (**Jayakumar et al., 2016**).

La stabilisation des membranes des érythrocytes humains contre l'hémolyse hypotonique thermique en présence des extraits de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie, peut indiquer une limitation de la fuite des enzymes hydrolytiques responsables de l'augmentation du stress oxydatif et de la dégradation des tissus, ce qui bloque par la suite cette voie inflammatoire (**Drăgan et al., 2016**).

Généralement, les extraits aux propriétés de stabilisation membranaire sont bien connus pour leur activité d'interaction avec la phase précoce de la libération des médiateurs inflammatoires (**Aitadafoun et al., 1996**).

III.4.3. Activité anticoagulante

Le processus de coagulation est le résultat d'une série de réactions enzymatiques qui se déroule en trois étapes : formation de l'activateur de la thrombine ; activation de la prothrombine en thrombine ; et la transformation du fibrinogène en fibrine (**Wang et al., 2011**). La coagulation pourrait être divisée en voie endogène initiée par des substances à l'intérieur du vaisseau sanguin endommagé, et exogène activée lorsque le sang est exposé à des facteurs tissulaires de la surface des cellules extravasculaires (**Ryu et al., 2013; Zong et al., 2017**).

Ce système coagulant est en équilibre dynamique avec le système anticoagulant dans le corps, dont le trouble peut provoquer des désordres cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde et la thrombose cérébrale (**Zong et al., 2017**).

Selon **Ryu et al. (2013)**, les tests APTT et PT sont de loin les tests de dépistage les plus courants des anomalies de la coagulation. Le test APTT est utilisé pour évaluer l'inhibition des facteurs intrinsèques des voies de coagulation sanguine tels que les facteurs XII, XI, V, III IX et la prékallikréine, tandis que le test PT est évalué pour examiner l'inhibition de la voie de coagulation extrinsèque, en particulier les facteurs V, VII et X (**Kamal et al., 2007**).

Cependant, l'attention croissante accordée aux plantes médicinales pour l'inhibition de la coagulation, au détriment des médicaments chimiques à effets indésirables, est impliquée actuellement comme une stratégie de traitement des maladies thrombotiques. La prolongation du temps partiel de thromboplastine activée (APTT) et du temps de prothrombine (PT) indique un effet positif des molécules testées sur les voies intrinsèques et extrinsèques de la coagulation, respectivement (**Ku et Bae, 2014**).

III.4.3.1. Effet des extraits de nopals sur le Temps de Quick (TQ) ou Temps de Prothrombine (TP) et le Temps de Céphaline-Kaolin (TCK) ou Temps partiel de thromboplastine activée (APTT)

Les résultats de l'effet des extraits de nopals sur le temps de thromboplastine partielle activée (APTT) et le temps de prothrombine (PT) sont reportés dans les figures 15 et 16. L'extrait d'alcaloïdes des jeunes nopals de cette étude a été le plus efficace parmi tous les extraits dans l'allongement du PT, suivis des extraits de polyphénols, de bétalaines et de caroténoïdes.

Concernant l'effet anticoagulant maximal, les polyphénols ont repoussé le PT contrôle de $12.13 \pm 1.45s$ à $16.9 \pm 2.16s$, où ils donnent un dédoublement maximal de 1.39 à $125\mu g/mL$. Les alcaloïdes et les caroténoïdes ont prolongé le PT témoin à $15.11 \pm 1.94s$ et $13.9 \pm 1.72s$, respectivement. Cette plus forte prolongation est estimée à une démultiplication de 1.24 et 1.14 fois pour les alcaloïdes et les caroténoïdes, respectivement. En présence des bétalaines, l'allongement positif était le plus faible et égale à 1.1 fois ($13.4 \pm 1.78s$), pour les classer en dernière position en termes d'anticoagulant exogène.

L'effet de l'héparine sur le PT est significativement ($p < 0,05$) plus élevé ($138.64 \pm 8.27s$) que celui de tous les extraits de métabolites de jeunes cladodes étudiés dans ce travail, et représente 11.42 fois celui noté pour le PT contrôle (fig.15). Une telle ampleur de l'effet dose-dépendant de l'héparine a été également rapportée par **Zong et al. (2017)**.

Quant au temps APTT, les quatre extraits n'ont pas pu améliorer la ligne de base du témoin correspondante à un temps de $30.1 \pm 3.88s$ et participent même à sa réduction (fig.16). L'abaissement maximal marqué a été de $28.1 \pm 6.09s$ pour les alcaloïdes, $27.3 \pm 3.14 s$ pour les bétalaines, $25.5 \pm 3.26s$ pour les polyphénols et de $22.3 \pm 4.45s$ pour les caroténoïdes. Les métabolites secondaires de nopals d'Algérie sont loin d'être proposés comme des remèdes anticoagulants, sachant que la plage thérapeutique de l'APTT citée par **Mohd Nor et al. (2019)** se situe entre 70 et $120s$ environ.

En allongeant le temps APTT d'une manière dépendante de la concentration, l'héparine a augmenté le temps témoin de $30.1 \pm 3.88s$ à $627.98 \pm 13.21s$, soit un doublement de 20.86 fois. L'héparine est un polysaccharide sulfaté qui exerce son action anticoagulante en se liant à un site spécifique de l'antithrombine, ce qui provoque un changement de conformation qui expose le site de liaison avec le facteur Xa et la thrombine (IIa). Ceci augmente l'activité anticoagulante de l'antithrombine d'environ 1000 fois (**Blann et Khoo, 2009; Mohd Nor et al., 2019**).

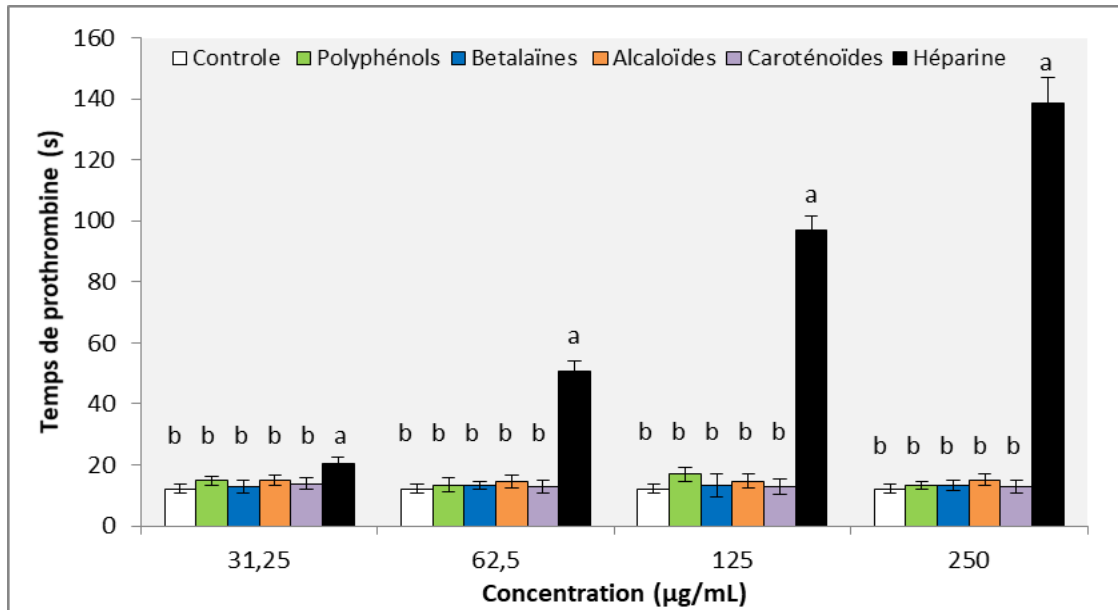


Figure 15 : Activité anticoagulante de différentes concentrations (31.25, 62.5, 125 et 250 µg/mL) d'extraits de polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et d'alcaloïdes de jeunes nopals de l'*Opuntia* d'Algérie, comparée à celle des mêmes concentrations d'héparine comme anticoagulant standard, sur la voie exogène par temps de prothrombine "PT". Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.

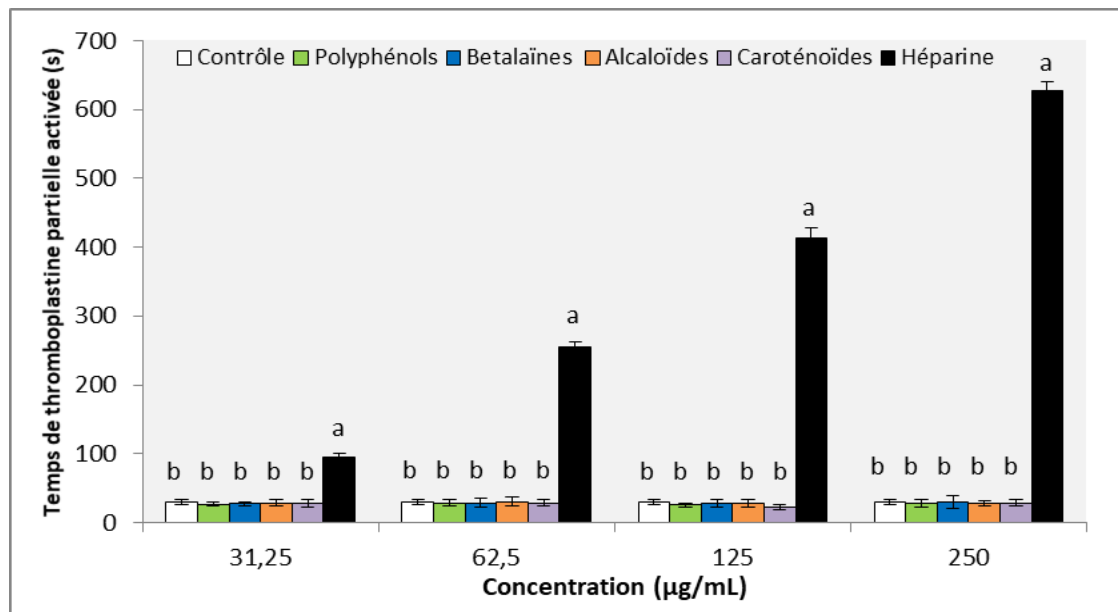


Figure 16: Activité anticoagulante de différentes concentrations (31.25, 62.5, 125 et 250 µg/mL) d'extraits de polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et d'alcaloïdes de jeunes nopals de l'*Opuntia* d'Algérie, comparée à celle des mêmes concentrations d'héparine comme anticoagulant standard, sur la voie endogène par temps de thromboplastine partielle activée "APTT". Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.

L'extrait d'alcaloïdes de jeunes nopals d'Algérie s'est révélé être, globalement, le meilleur modulateur des deux voies de coagulation par rapport aux extraits des autres métabolites. Leur faible effet anticoagulant a été attribué au fait que les alcaloïdes identifiés dans ce travail soient dépourvus de résidus de sucres et de sulfates, à l'exception de la glucobrassicine qui contenait un groupe sulfate. Les métabolites alcaloïdes du vinaigre de riz ont prolongé considérablement le PT de 1.1 fois et augmenté l'APTT de 1.34 fois (**Ning et al., 2017**). Cependant les alcaloïdes stéroïdes analysés par **Song et al. (2012)** n'ont montré aucune influence significative sur les paramètres de coagulation PT et APTT.

Parmi les alcaloïdes étudiés par **Lee et al. (2016)**, une polyamine acylée, un alcaloïde quinoline sulfaté et de l'acide indole acétique se sont avérés actifs, bien qu'en moindre degré que l'héparine, dans l'inhibition de la coagulation par prolongement du PT et de l'APTT. L'augmentation de l'APTT témoin par ces alcaloïdes utilisés à trois concentrations différentes comprises entre 1 et 5 μM était 2.45, 2.24 et 2.38 fois, alors qu'elle était de 2.29, 2.11 et 2.19 fois le PT témoin.

Lee et al. (2016) trouvent dans des tests complémentaires que l'anticoagulation par les alcaloïdes repose sur l'inhibition de l'activité et de la production de thrombine et de facteur Xa. Conformément à ces potentialités anticoagulantes in vitro, ces alcaloïdes ont montré des effets améliorés dans un modèle d'embolie pulmonaire et de thrombose artérielle chez la souris in vivo (**Lee et al., 2016**). Cependant, les autres alcaloïdes dans l'étude de ces auteurs, tels que le jineol, la 3-methoxy-8-hydroxy-quinolin-2-one, la 3,4-dimethoxy-8-hydroxy-quinolin-2-one et la scolopendrine, n'ont pas modifié le temps de coagulation in vitro.

Les polyphénols de jeunes nopals d'Algérie sont plus puissants que ceux testés par **Ryu et al. (2013)**, qui affichent un allongement maximum de 1.32 fois pour une gamme de concentration comprise entre 0.1 et 2 mg/mL. Les polyphénols testés par **Zong et al. (2017)**, à un intervalle de concentration semblable à celui utilisé dans la présente expérience (i.e 50-200 $\mu\text{g/mL}$), ont manifesté une relation dose-effet lors d'une prolongation significative ($p < 0.01$) de PT 2.24 fois plus élevée que celle notée dans cette étude.

Dans l'étude de **Zong et al. (2017)**, l'APTT induit par les polyphénols représente 3.39 fois celui trouvé dans la présente étude. Ces auteurs n'ont pas observé d'effet sur l'APTT en utilisant le flavonoïde majeur de leur extrait, la jaceosidine, seul. Les flavonoïdes et les tanins ont affiché leur effet sur le PT et l'APTT par des coefficients de corrélation qui atteignent, respectivement, 0.99 et 0.85 (**Adli et al., 2016**). Cependant, **Wang et al. (2011)** ont noté

l'absence d'effets de la catéchine et de l'épigallocatechine gallate du thé vert sur les paramètres de coagulation tels que le PT et l'APTT in vitro.

Khoo et al. (2014) ont montré que les polyphénols associés aux polysaccharides prolongeaient potentiellement la coagulation sanguine dans la voie intrinsèque en tant qu'agent anticoagulant. Des travaux antérieurs ont rapporté l'effet des polyphénols, y compris la réactivité élevée de l'acide caféique identifié dans la présente étude, sur la prolongation du temps de coagulation (**Chao et al., 2009**). Dans une autre étude utilisant les polyphénols, **Bijak et al. (2014)**, choisissent le facteur (Xa) comme nouvelle cible pour la thérapie anticoagulante moderne. Leurs résultats confirment que seuls quatre flavonoïdes ; incluant la quercétine présente dans l'extrait de nopals, ont un effet inhibiteur sur l'activité FXa, et pourraient être des bases structurelles potentielles pour la conception de nouveaux inhibiteurs directs de FXa, sûrs et biodisponibles par voie orale. **Kuntic et al. (2011)** ont montré que la rutine de citron pouvait prolonger l'APTT in vitro.

Dans l'ensemble, les bétalaïnes identifiés dans cette étude n'ont aucune activité anticoagulante. Une légère interférence des bétalaïnes avec l'intégrité protéique des facteurs de coagulation extrinsèques (facteurs tissulaires), en particulier avec le facteur VII rapporté par **Hall et Guyton (2011)**, pourrait expliquer la faible modulation de la voie exogène et par la suite du temps de prothrombine PT.

L'accélération du temps de thromboplastine partielle activée APTT dans le cas des bétalaïnes pourrait être clarifiée par une stimulation de facteurs endogènes (facteurs de contact) ou une intensification de la réaction thrombine-fibrinogène. Cette dernière a été enregistrée pour plusieurs phyto-molécules (**Omar et al., 2019**). Pour être efficaces comme anticoagulant, les bétalaïnes doivent inhiber ou diminuer la production et l'activité de facteurs de coagulation tels ceux enregistrés par **Omar et al. (2019)**; facteurs tissulaires, thrombine, vitamine K-époxyde réductase et récemment facteur X.

Pour les caroténoïdes, l'administration de l'asaxanthine aux rats normaux n'a causé aucune différence dans les niveaux de PT et d'APTT. Cependant, les PT et APTT réduits chez les rats hyperlipidémiques, ont été prolongés significativement de 1.3 et 1.7 fois en présence de ce caroténoïde (**Deng et al., 2017**). Les résultats de **Yaping et al. (2003)** ont montré que le lycopène augmentait le temps de coagulation de 1.58 fois, bien que la réponse ne soit pas affectée par la dose administrée.

Dans l'optique de ces résultats contradictoires, il est vraisemblable qu'il existe une proportionnalité entre l'action anticoagulante très faible, voire absente, des extraits de nopals et leur structure moléculaire. Ainsi, un effet agoniste/antagoniste entre les différentes classes des métabolites de chaque extrait de nopals existe, et c'est le plus prépondérant au cours de leur intervention sur les deux voies de coagulation.

En outre, il semblerait vraisemblable que le faible pouvoir anticoagulant des extraits de nopals serait lié à l'absence ou à la très faible présence des sucres et du soufre dans leur structure. La présence des résidus de sucres et leurs solubilité ainsi que le contenu en sulfates dans la structure moléculaire a été indiquée comme responsable de l'activité anticoagulante (**Chaouch et al., 2018; Omar et al., 2019**).

L'activité biologique du fragment osidique est liée principalement à sa structure et taille moléculaire, à son type et à la quantité de sucres et de sulfates (**Shanmugam et Mody, 2000; Shobharani et al., 2014**). Comme ce fut rapporté par **Pomin (2013)**, même si d'autres paramètres sont similaires «le profil de sulfatation, la configuration anomérique, la liaison glycosidique et la masse moléculaire», une seule différence structurelle dans le type de sucre peut faire un grand changement dans l'activité anticoagulante. En outre, les polysaccharides anticoagulants présentent cette activité en raison de la présence de charges, principalement des groupes sulfate et carboxyle dans leurs structures (**Melo-Silveira et al., 2012**).

Par ailleurs, la présence du phénol dans la structure de ces molécules de nopals est responsable d'une action complexe qui promeut la coagulation sanguine. Il stimule l'activation du facteur 3 plaquettaire et du facteur XII, il accélère l'interaction thrombine-fibrinogène et retarde la rétraction du caillot, comme il augmente l'action de la streptokinase sur la plasminogène et inhibe la plasmine (**Nour-Eldin, 1968**).

L'effet inhibant faible marqué sur la voie exogène cotoyé d'un maintien du fonctionnement normal de la voie endogène, ou bien même une action pro-coagulante sur elle ; nous laissent penser que ces extraits désactivent exclusivement les facteurs extrinsèques et plus spécialement le facteur VII ou proconvertine. Le facteur tissulaire thromboplastine est intouchable puisque absent dans un système in vitro. Les facteurs de la voie commune, partagée entre les deux voies, à savoir FX, V et thrombine, ainsi que ceux endogènes (IX, XI, XII, VIII et prékallikréine) sont épargnés, et peuvent par ailleurs s'intensifier en action par la présence des extraits.

Pour éclaircir le faible allongement du PT en présence des extraits de nopals, on peut évoquer une action inhibitrice légère sur l'activation et la fonctionnalité du facteur VIIa. Des liaisons avec cette protéine ou un changement partiel de charges de la séquence protéique de son site actif, peuvent conduire à la dénaturation ou masquage de ce dernier et décroître la puissance catalytique de l'enzyme. Par ailleurs, la γ -carboxylation de l'acide glutamique (Glu) de la chaîne polypeptidique du facteur VII est nécessaire pour leur capacité de liaison au calcium et donc leur activation physiologique (Ayodele *et al.*, 2019). Cette carboxylation est assurée par une carboxylase dont l'inhibition peut présenter un autre mécanisme d'allongement de PT par nos extraits suite à l'immaturation de FVII.

Par ailleurs, on suggère que l'accélération de l'APTT pourrait être dûe au blocage des inhibiteurs des enzymes de la voie endogène et commune, et probablement à un apport supplémentaire de calcium qui se trouve en abondance dans les nopals. Si cette hypothèse est vraie, l'accroissement de la voie commune est capable de cacher l'effet anticoagulant réel des métabolites testés sur la voie extrinsèque.

Nos résultats, s'ils venaient à être confirmés *in Vivo*, constituent un argument en faveur d'une possible utilisation des nopals sans courir le risque de perturbation de l'hémostase. L'effet pro-coagulant des extraits de nopals par stimulation des facteurs endogènes pourrait s'opposer à l'action anticoagulante de ces mêmes extraits sur la voie exogène, laissant ainsi le processus de coagulation sans modification. De Souza *et al.* (2019) signalent que la division de la cascade de coagulation en ces voies n'est qu'un concept utile pour interpréter les résultats d'une telle enquête, et n'a aucune validité *in vivo*.

III.4.4. Activité antimicrobienne

III.4.4.1. Diamètres des zones d'inhibition des microorganismes exposés à l'extrait de cladodes

Les zones d'inhibition des quatre extraits de nopals sont regroupées dans le tableau 11. Les résultats montrent que seul l'extrait polyphénolique a pu présenter un effet antimicrobien et antifongique qui varie d'une souche à une autre. Les bétalaïnes, caroténoïdes et alcaloïdes de nopals sont inefficaces aux concentrations testés vis-à-vis de toutes les souches utilisées vu qu'aucune zone d'inhibition n'a été obtenue.

La souche *Bacillus cereus* ATCC 10876 était la plus sensible (25 ± 0.14 mm) envers ces polyphénols, suivie de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (16 ± 0.25 mm) et de la levure

Candida albicans ATCC 10231 (13 ± 0.11 mm). Cependant, la souche bénéfique *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* a donné la zone d'inhibition la plus faible (7 ± 0.1 mm), indiquant alors le plus de résistance parmi toutes les souches de l'étude.

La comparaison de la concentration d'extrait phénolique de nopals d'Algérie utilisée dans notre analyse (2 mg/mL) avec celle de l'étude de **Pooja et Vidyasagar (2016)** sur les cladodes d'*Opuntia* de l'Inde (40 mg/mL, soit 20 fois plus) ; met en relief son plus fort pouvoir antimicrobien contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (15 ± 0.2 mm) ou *Candida albicans* ATCC 10231 (13 ± 0.11 mm) versus celui rapporté par ces auteurs pour ces mêmes souches avec l'extrait phénolique chloroformique (18.7 et 20.1 mm, respectivement) ou méthanolique (18.2 et 21.3mm, respectivement).

Cette grande différence dans l'efficacité de l'activité antimicrobienne de nos extraits phénoliques avec celle rapportée par **Aruwa et al. (2019)** nous interpelle sur la véracité de nos observations. En effet, avec une concentration d'extrait phénolique 150 fois plus élevée (300mg/mL) que la notre (2mg/mL), ces auteurs obtiennent une zone d'inhibition de la croissance de *Klebsiella pneumonia* de seulement 20mm versus 16mm obtenu avec notre extrait. C'est pourquoi, nous considérons nos résultats avec réserve.

La même prudence doit être de mise quant aux diamètres d'inhibition obtenus dans ce travail pour *Staphylococcus aureus* (12 ± 0.1 mm) et *E.coli* (10 ± 0.15 mm). En effet, avec une concentration d'extrait méthanolique de polyphénols de nopals du Mexique 100 fois supérieure (200mg/mL) à celle utilisée dans cette expérience (2mg/mL), **Sánchez et al. (2016)** obtiennent un même et faible diamètre de zone d'inhibition pour ces deux mêmes souches (16mm). En revanche, **Ginestra et al. (2009)** ont rapporté que différentes fractions phytochimiques polyphénoliques d'*O. ficus-indica* du sud de l'Italie, ne présentaient aucune activité antimicrobienne contre les souches bactériennes testées, y compris *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Le test de diffusion sur puits est une technique qualitative utilisée principalement pour sélectionner des extraits ayant une activité antimicrobienne, surtout lorsque les diamètres des zones d'inhibition sont ≥ 10 mm (**Usman et al., 2009**). Cependant, les faibles concentrations utilisées (2mg/mL) pourrait, vraisemblablement, être la cause de l'absence d'effet antimicrobien pour les bétalaines, caroténoïdes et alcaloïdes de nopals. L'absence d'activité antibactérienne pour ces extraits devrait être vérifiée par utilisation de concentrations d'extrait beaucoup plus

élevées comme cela a été toujours le cas dans toutes les autres études des auteurs cités précédemment (Aruwa *et al.*, 2019 ; Sánchez *et al.*, 2016 ; Velicanski *et al.*, 2011).

Tableau 11: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance de différentes souches exposées à une concentration de 2mg/mL d'extrait phénolique de jeunes nopals d'*Opuntia* d'Algérie.

La souche	Polyphénols	Bétabalaines	Caroténoïdes	Alcaloïdes
Bactérie Gram +				
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	25±0.14	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	12±0.1	-	-	-
Bactérie Gram -				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15± 0.2	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10± 0.15	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	12±00	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	16±0.25	-	-	-
Bactérie bénéfique				
<i>Bifidobacterium animalis subsp lactis</i>	07±0.1	-	-	-
Souche fongique				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13±0.11	-	-	-

Guinoiseau (2011) trouve que les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont plus élevées pour les phyto-molécules que pour celles issues de bactéries et de champignons. De même, Tenore *et al.* (2012), ont signalé un large spectre d'activité antimicrobienne aux extraits riches en bétabalaines contre *B. cereus* et *C. albicans* à des concentrations de 125-250 mg/mL. Les halos inexistantes pour *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* à 1mg/mL de bétabalaines, s'accroissent à un intervalle de 8.3-14.6 mm lorsque cette concentration est augmentée à 8 mg/mg/mL (Vijaya et Thangaraj, 2019). De plus, dans l'étude menée par Dzedzic *et al.* (2015), la CMI de l'alcaloïde berbérine utilisé lui seul en forme pure était 0.51 mg/ mL. En 2014, Natividad et Rafael trouvent que parmi les extraits étudiés, celui de *Bixa Orellana* L. a la plus grande teneur (931.30 µg/g) de caroténoïdes et a montré la plus haute activité contre *S. aureus* (9.17 mm).

En retenant que dans ce travail, la faible concentration des extraits en métabolites reste le principal facteur d'absence d'activité antimicrobienne, l'inexistence des molécules à effet antimicrobien dans ces extraits est un autre argument qui pourrait justifier cette absence d'efficacité. La berberine, la piperine et la reserpine non identifiées dans notre extrait d'alcaloïdes, ont démontré un effet inhibant la pullulation streptococcique, d'*E. coli* et de *K. pneumoniae*, respectivement (Barbieri *et al.*, 2017).

Ainsi, la présence des principes actifs antimicrobiens dans des mixtures peut probablement atténuer leur activité. **Parekh et Chanda (2008)** avaient montré que certains constituants peuvent exercer des effets antagonistes ou annuler les effets positifs des agents bioactifs. Les extraits de caroténoïdes de carotte, de maïs et de tomate étaient incapables d'inhiber *E. coli*, à un moment où des molécules typiques de cette classe, comme le lycopène isolé, bloquaient efficacement la croissance de cette souche (**Natividad et Rafael, 2014; Dos Santos et al., 2015**). La combinaison de céphalexine et d'amoxicilline avec le lycopène a considérablement diminué l'activité antibactérienne de ces médicaments (**Dos Santos et al., 2015**).

Les résultats du présent travail suggèrent que la haute teneur en polyphénols dans l'extrait phénolique de nopals ; notamment les flavonoïdes, les tannins et les acides phénols, est responsable de son effet antimicrobien important comparé à celui rapporté par d'autres études. **Chaalal (2012)**, a signalé que ces classes sont utilisées comme mécanisme de défense par les plantes contre les microorganismes et les insectes.

Un bon nombre de ces composés phénoliques identifiés dans cette étude, ainsi que d'autres cités comme présents dans les cladodes d'*Opuntia* par **Aruwa et al. (2019)** (les acides : gallique, piscidique, eucomique, férulique et coumarique), ainsi que la nicotiflorine, la narcissine, la catéchine et l'épigallocatechine, l'isorharmnetine 3-O-glucoside et les flavonoïdes de rutine, possèdent des activités antimicrobiennes attribuées à leurs structures aromatiques hydroxylées bioactives (**Guevara-Figueroa et al. 2010; Kurek et al., 2011; Chaalal, 2012**). La toxicité des composés antimicrobiens sur les microorganismes est déterminée par le site et le nombre de groupes hydroxyle et s'accroît avec l'augmentation de celui-ci (**Ciocan et Bara, 2007**).

L'efficacité antimicrobienne des polyphénols de nopals est multifactorielle. Elle est non seulement dépendante de leur structure et concentration, mais aussi fortement influencée par le solvant d'extraction choisi, les conditions de culture, l'espèce microbienne testée et sa densité. La sensibilité des bactéries aux médicaments dépend de leurs caractéristiques d'hydrophobicité ou d'hydrosolubilité, et de la composition de la membrane microbienne (**De Almeida et al., 2010**).

Par ailleurs, l'extraction hydro-alcoolique employée dans ce travail assure la présence simultanée de composés polaires et d'autres résidus actifs non polaires, ce qui améliore le pouvoir antimicrobien in vitro (**Aruwa et al., 2019**). **Gnanakalai et Gopal (2016)** ont attribué la faible activité antibactérienne des extraits aqueux d'*Opuntia* à la solubilité faible de ses

composants biologiquement actifs. La polarité des composés obtenus est fondamentale dans l'effet antimicrobien exprimé par la taille des zones d'inhibition. Un extrait plus diffusible mais moins actif pourrait donner un diamètre d'inhibition plus grand qu'un extrait non diffusible mais plus actif (**Savaroglu et al., 2011**).

En général, les composés phénoliques sont impliqués dans les dommages de la membrane et la perturbation de la paroi, la liaison aux protéines et l'inactivation des enzymes, provoquant alors des effets statiques ou cidaux. Ainsi, ils peuvent agir comme pro-oxydants, provoquant des dommages à l'ADN, aux lipides et à d'autres molécules biologiques (**Duda-Chodak et al., 2015; Aruwa et al., 2019**).

Les tanins et les polymères de phénols agissent par liaison aux parois cellulaires, et inactivation des enzymes microbiennes et des transporteurs protéiques ; ce qui empêche l'adhérence et la croissance microbienne et inhibe l'activité des protéases (**Cowan, 1999; Ciocan et Bara, 2007**). De plus, les tanins sont capables de complexer les polymères et les minéraux, rendant les nutriments indisponibles (**Smith et al., 2005**).

En plus de la détérioration de l'intégrité de la paroi bactérienne extracellulaire, les flavonoïdes provoquent la mort bactérienne en inhibant la synthèse d'ADN ou d'ARN (**Cushnie et Lamb, 2005**). Le cycle B des flavonoïdes comme (-) epigallocatechin, pourrait inhiber la synthèse de l'ADN et de l'ARN par intercalation ou liaison hydrogène avec l'empilement des bases d'acide nucléique (**Mori et al., 1987**). Par ailleurs, **Ohemeng et al. (1993)** et **Plaper et al. (2003)** avaient montré que les flavonoïdes ayant un cycle B hydroxylé comme la quercétine, inhibent l'enzyme ADN-gyrase selon un mode d'action similaire à celui adopté par l'antibiotique novobiocine. La quercétine se lie et inhibe l'activité de la sous-unité ATPasique GyrB de cette enzyme essentielle à la réplication du chromosome circulaire de la bactérie (**Plaper et al., 2003**). **Bernard et al. (1997)** ont constaté que le flavonol glycosylé rutine était très efficace comme inhibiteur naturel de la topoisomérase ; une enzyme responsable de la diminution du surenroulement de l'ADN qui gêne sa réplication et transcription par les polyméras.

En outre, **Ikigai et al. (1993)** avaient rapporté que les catéchines, en l'occurrence (-) l'épigallocatechine gallate fortement antibactérienne, agissent principalement en endommageant les membranes bactériennes. **Sirk et al. (2011)** ont également rapporté que le mécanisme antimicrobien des catéchines peut être régi par la liaison hydrogène de leurs groupes hydroxyle aux bicouches lipidiques des membranes cellulaires. Les catechines peuvent perturber les bicouches lipidiques en les pénétrant directement et en perturbant la fonction barrière.

Alternativement, elles provoquent une fusion membranaire qui entraîne une fuite des matériaux intra-membraneux et une agrégation (Ikigai *et al.*, 1993). D'après Ikigai *et al.* (1993), les catéchines détectées dans les nopals de cette étude, semblent avoir une plus grande activité contre les bactéries Gram-positives que contre les bactéries Gram-négatives incluant des lipopolysaccharides à effet de barrière.

De même, la naringénine exerce une activité antibactérienne en réduisant la fluidité des couches externes et internes des membranes des cellules bactériennes (Tsuchiya *et al.*, 1994). Mirzoeva *et al.* (1997) ont montré que l'activité antibactérienne de la quercétine découle de l'augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne interne et de la dissipation du potentiel membranaire ; énormément nécessaires pour la synthèse d'ATP, le transport membranaire et la motilité. De plus, il est à penser que la quercétine et la naringénine inhibent la pathogenèse bactérienne et le développement de l'infection en bloquant la chimiotaxie et la motilité bactérienne qui guident les bactéries vers leurs sites d'adhérence et d'invasion (Mirzoeva *et al.*, 1997).

Similairement aux antibiotiques inhibiteurs respiratoires, l'interférence de certains flavonoïdes avec le métabolisme énergétique est un autre outil d'inhibition microbienne. Ces flavonoïdes inhibent efficacement la NADH-cytochrome c réductase dans la chaîne de transport d'électrons respiratoire bactérienne, et empêche par conséquent la production d'énergie nécessaire à l'absorption active de divers métabolites et à la biosynthèse des macromolécules (Haraguchi *et al.*, 1998). La synthèse des protéines et des lipides sera également affectée par la présence de cette sous-classe de polyphénols (Cushnie et Lamb, 2005).

L'étude de la relation structure-activité antibactérienne des flavonoïdes a identifié des caractéristiques structurales communes nécessaires pour gagner la proximité ou assurer l'absorption dans la cellule bactérienne. Cependant, les flavonoïdes antibactériens actifs ont plusieurs cibles cellulaires, plutôt qu'un site d'action spécifique (Cushnie et Lamb, 2005).

Les travaux d'Osawa *et al.* (1992) suggèrent que l'hydroxylation des flavones, flavanones, isoflavones et isoflavanones en position 2' est importante pour l'activité antimicrobienne. L'importance de l'hydroxylation en position 2' pour l'effet antimicrobien est affirmée par Tsuchiya *et al.* (1994), qui ont établi une relation structure-activité pour les flavanones en déterminant leurs CMI contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline. Ils ont indiqué que la dihydroxylation des flavanones en position 2',4'- ou 2',6'- du cycle B, et en position 5,7- du cycle A, étaient importantes pour l'activité anti-*S.aureus*. L'importance d'un

groupe hydroxyle en position 5 des flavanones et flavones pour l'activité contre cette souche, est aussi confirmée par **Alcaráz et al. (2000)**.

La substitution en position 6 ou 8 avec un groupe aliphatique à longue chaîne a également amélioré l'activité des flavanones (**Tsuchiya et al., 1994**). Une publication de **Stapleton et al. (2004)** avait démontré que la substitution des flavan-3-ol (catéchine) par des chaînes C8 et C10 améliorerait également leur activité anti-staphylococcique. L'halogénéation du cycle B par 3'-chloro, 4'-chloro et 4'-bromo a dédoublé l'efficacité du flavonoïde père contre *S. aureus* (**Ward et al., 1981**). Par contre, Il a été rapporté que les groupes méthoxy et l'halogénéation du cycle A en position 6 diminuaient considérablement l'activité antibactérienne des flavonoïdes (**Alcaráz et al., 2000; Ward et al., 1981**).

La meilleure activité des polyphénols des jeunes raquettes d'*Opuntia* est notée chez une bactérie Gram positif ; *Bacillus cereus*. Ceci indique plus d'efficacité de ces polyphénols contre les Gram positif que les Gram négatif. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Welegerima et al. (2018)** sur les composés phénoliques des cladodes du Nord de l'Ethiopie. Cette résistance supérieure des bactéries Gram-négatives est attribuée à leur membrane cellulaire essentiellement constituée de lipopolysaccharides hautement hydrophiles, qui restreignent l'infiltration des composés hydrophobes et évite donc l'accumulation d'extraits organiques dans la membrane cible. Par contre, chez les Gram-positif, les extrémités lipophiles de la couche peptidoglycane externe facilitent la diffusion de ces composés hydrophobes (**Pompeu et al., 2015; Aruwa et al., (2019)**).

Les bactéries à Gram négatif possèdent ainsi le système de pompes à résistance multidrogue (multidrug resistance pumps MDR) ou pompes efflux, qui peut induire la résistance aux agents antimicrobiens par leur extrusion hors bactérie (**Wendakoon et al., 2012; Ramírez-Moreno et al., 2017**).

III.4.4.2. Niveaux des concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)

Le tableau 12 regroupe l'ensemble des concentrations minimales inhibitrices, bactéricides ou fongicides de l'extrait phénolique de jeunes nopals d'Algérie. Les CMI trouvées varient de 0.25 à 0.50mg/mL et sont dix fois plus faibles que celles rapportées pour l'extrait hydro-méthanolique de polyphénols de nopals de l'Afrique du Sud par **Aruwa et al. (2019)** pour tous les microorganismes testés.

Tableau 12: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide/fongicide (CMB/CMF) de l'extrait phénolique de jeunes nopals d'*Opuntia* d'Algérie.

La souche	CMI (mg/mL)	CMB/CMF (mg/mL)
Bactérie Gram +		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	0.25	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	0.5	1
Bactérie Gram -		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.5	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.5	1
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	0.5	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	0.5	1
Bactérie bénéfique		
<i>Bifidobacterium animalis subsp lactis</i>	R	R
Souche fongique		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.5	1

La bactérie bénéfique, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* (Bb12) a fait l'exception et n'a montré aucune sensibilité aux polyphénols de nopals aux concentrations testées. Ce résultat confirme celui du test de diffusion sur gélose par puits. Ainsi, une fourchette de CMI plus haute mais très proche (1.25 à 2.5 mg/mL) a été signalée par **Moosazadeh et al. (2014)** pour l'extrait de fruit d'*Opuntia* contre *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*.

L'intervalle de concentration minimale bactéricide des polyphénols de nopals d'Algérie était de 0.5 à 1 mg/mL pour les différentes souches testées. **Sánchez et al. (2016)** ont décrit pour les cladodes d'*Opuntia* une CMB de 4 mg/mL et 1 mg/mL, contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, respectivement.

L'activité fongistatique des polyphénols des nopals contre *Candida albicans* était de l'ordre de 0.5 mg/mL, alors que la concentration minimale fongicide atteint 1mg/mL. L'extrait phénolique des jeunes nopals d'Algérie est plus puissant contre cette levure que celui des feuilles de thé vert aux CMI de 12.5, 25 et 100 mg/mL pour des charges de la même levure de 0.5×10^3 , 1×10^3 et 2×10^3 cellules/mL (**Yadegari et al., 2009**). Or, l'activité antifongique des fractions hexanique, chloroformique et éthanolique des cladodes de *Nopalea cochenillifera* contre *C. albicans* était remarquablement plus élevée au vu des faibles CMI enregistrées (**250, 250 et 3.9 µg/mL**, respectivement) (**Gomez-flores et al., 2006**).

Actuellement, l'antibiorésistance constitue le plus grand défi que les microorganismes posent à l'humanité qui, pour l'instant, ne dispose pas de solution durable. L'utilisation des composés phytochimiques naturels est une des solutions envisageables en raison de la diversité

végétale en tant que source en biomolécules actives pouvant rivaliser ou contrer la redoutable diversité des microorganismes. C'est cette nouvelle stratégie palliative qui pourrait, à court et moyen terme, contribuer à relever partiellement ce défi (**Welegerima et al., 2018**).

Tegos et al. (2002) suggèrent que les phytomolécules à CMI de l'ordre de 100 à 1000 µg/mL peuvent être considérées comme antimicrobiens. Néanmoins, ces auteurs précisent que les antimicrobiens végétaux ne sont actuellement pas utilisés de manière systématique en raison de leur faible activité, en particulier contre les bactéries à Gram négatif, vu que leurs CMI restent encore supérieures à celles des antibiotiques bactériens et fongiques typiques (0.01 à 10 µg/mL).

Aruwa et al. (2019) attribuent le large spectre d'activité antimicrobienne des polyphénols à la teneur de composés polyhydroxylés, d'acides phénoliques et de dérivés de flavonoïdes. Certains auteurs (**Kalil et al., 2014 ; Moosazadeh et al., 2014**) font le lien entre la variation des CMI et les différences mineures dans les techniques appliquées telles que la durée d'incubation et la taille de l'inoculum utilisée. Dans ce sens, le méthanol utilisé comme solvant d'extraction dans notre étude permet d'obtenir le maximum de composés phénoliques de nopals. La polarité du méthanol assure l'extraction de phyto-composés antimicrobiens actifs polaires et modérément polaires comme les tanins, les flavones et les polyphénols (**Cowan, 1999**).

L'âge des nopals est un autre paramètre signalé par **Blando et al. (2019)** responsable des différences dans le degré d'inhibition de la croissance bactérienne. Ces auteurs ont montré que la bactérie à Gram négatif, *Escherichia coli* ATCC 25922, et à Gram positif, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ont été respectivement inhibées à des concentrations de 2 et 1.5 mg/mL d'extrait de cladode mature, et de 1.5 et 1 mg/mL de cladode immature. De ce fait, les métabolites des cladodes immatures, autrement dit en jeune âge ou nopals, sont plus efficaces comme source d'agents antimicrobiens par rapport à ceux des cladodes âgés ou matures.

La souche *B. animalis* subsp. *Lactis* (Bb12) fait partie du microbiote intestinal normal du tractus gastro-intestinal des humains et des animaux, et est volontairement ajoutée dans les aliments fonctionnels et les compléments alimentaires en tant que probiotique source de bien être (**Gwiazdowska et al., 2015**). L'effet antimicrobien des polyphénols reste très variable selon leur type, structure et leur concentration ; ainsi que selon l'espèce considérée (**Gwiazdowska et al., 2015**).

Selon **Gwiazdowska et al. (2015)**, l'impact de certains flavonoïdes comme la naringinine, la quercétine, la rutine, et des acides phénoliques p-coumarique, férulique, sinapique, caféique, chlorogénique, gallique et vanillique, testés à 2, 20 et 100 µg/mL sur la

croissance de *B. bifidum* et *B. adolescentis* a été différent, stimulants et inhibiteurs par rapport au témoin positif, en temps dépendance. Ils ont trouvé que les acides polyphénoliques stimulent les bifidobactéries mieux que les flavonoïdes. D'après ces chercheurs, l'acide caféique a stimulé la croissance des bifidobactéries contrairement au résultat de **Lee et al. (2006)**.

La croissance de *B. bifidum* a augmenté jusqu'à 37% en présence de rutine, contrairement au ralentissement observé par la quercétine et la naringine (**Gwiazdowska et al., 2015**). En plus, **Duda-Chodak (2012)** ont trouvé que la naringénine et la quercétine ralentissent ou même inhibent complètement la croissance de *Bifidobacterium catenulatum*, tandis que leurs glycosides ; naringine et rutine, n'exercent aucune inhibition et peuvent même en stimuler la croissance. L'effet stimulant des catéchines sur la croissance de *Bifidobacterium* sp. décrit par **Tzounis et al. (2008)** est absent dans le travail de **Duda-Chodak (2012)**.

Or, des espèces sont plus susceptibles que d'autres vis-à-vis des polyphénols, à l'exemple de *B. bifidum* qui y est plus sensible que *B. adolescentis* (**Gwiazdowska et al., 2015**). L'effet probiotique de l'acide caféique, coumarique et férulique remarqué à 100 mg/L, s'était converti en effet inhibiteur net à des concentrations de 500 et 1000 mg/L (**Stead, 1993**). **Gwiazdowska et al. (2015)** ont observé une inhibition dose-dépendante de *B. bifidum* par la quercétine. Par ailleurs, **Stead (1994)** a remarqué que l'effet des acides chlorogénique et gallique est dépendant de la phase de croissance des bactéries. Le plus fort impact des polyphénols testés par **Gwiazdowska et al. (2015)** sur la croissance des bifidobactéries était pendant les premières heures d'incubation.

Selon **Smith et al. (2005)**, les bactéries peuvent employer plusieurs mécanismes pour surmonter l'inhibition par les polyphénols ; notamment la modification/dégradation, la dissociation des complexes polyphénol-substrat, l'inactivation des polyphénols par des liants de haute affinité, la modification / réparation membranaire et la séquestration des ions métalliques.

En plus de cette résistance aux polyphénols, les *Bifidobacterium* sont capables de les métaboliser pour se croître et contribuer à la protection de la barrière intestinale (**Moreno-Indias et al., 2016**). Ce genre bactérien est apte à catalyser les réactions d'O-déglycosylation et fission du cycle C des flavonols (kaempférol, quercétine), d'hydrolyse des liaisons ester, clivage du cycle C et déshydroxylation des flavan-3-ols ; et l'O-déglycosylation, O-déméthylation, réduction, clivage du cycle C et déshydroxylation des isoflavones. En plus, l'O-déglycosylation, l'O-déméthylation, la fission du cycle C et la déshydroxylation au niveau du cycle B des flavones (lutéoline, apigénine), ainsi que la désestérification et la déshydroxylation des acides

phénoliques (acide caféique, acide férulique) font partie de leur mécanisme métabolique des polyphénols (Corrêa *et al.*, 2019).

Les polyphénols, dont l'existence dans les nopals est bien établie, se sont avérés antifongique dans d'autres études. La quercétine et le Kaempferol utilisés à une gamme de concentrations allant de 197 à 441 µg/mL et l'acide gallique à une CMI égale à 30 µg/mL, ont exercé une activité antifongique contre *Candida albicans*, comme rapporté par Herrera *et al.* (2010) et Picerno *et al.* (2011). *Candida albicans* est un mycète très résistant qui exprime aussi le transporteur d'efflux multidrogue (MET) comme un moyen de résistance (Hirasawa et Takada, 2004). Comme il existe actuellement peu de médicaments antifongiques efficaces disponibles pour le traitement de la candidose, il est essentiel de découvrir et d'évaluer de nouvelles sources d'agents antifongiques (Pooja et Vidyasagar, 2016).

Les polyphénols et les flavonoïdes peuvent autoréguler la transition morphogénique cruciale pour la virulence de la levure ; de la forme cellulaire à la forme hyphale (Farkach *et al.*, 2018). Les catéchines ont une activité de suppression enzymatique de protéasome de *candida albicans* ; produisant par conséquent, une instabilité métabolique, une diminution de croissance et de formation de biofilm. L'inhibition de protéasome accumule les inhibiteurs de la kinase cycline-dépendante (*Cyclin Kinase Inhibitor* : CKIs) dans la levure, ce qui perturbe la morphogénèse et le cycle cellulaire de cette levure (Evensen et Braun, 2009). Autrement, ces phénols perméabilisent la membrane cellulaire et perturbent la structure de la paroi de cette levure, permettant ainsi leur passage au cytoplasme pour exercer leur activité antifongique intracellulaire (Evensen et Braun, 2009).

Les résultats enregistrés pour l'extrait phénolique de nopal sont très prometteurs dans la lutte contre des bactéries d'importance alimentaire ou d'ordre de pathogénicité médicale. La recommandation de ces polyphénols pour l'industrie et la conservation alimentaire, ou même dans une optique d'exploration de nouveaux agents antimicrobiens d'utilisation pharmaceutique, passe forcément par le développement de techniques d'extraction, d'isolement et de purification non toxiques et appropriées à une consommation humaine (Bakari *et al.*, 2017; Aruwa *et al.*, 2019). Par ailleurs, les effets comportant les risques et les avantages de ces composés actifs sur la flore microbienne humaine normale doivent être déterminés (Sánchez *et al.*, 2014).

III.4.5. Cytotoxicité des métabolites de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie

Le foie est le carrefour essentiel pour de nombreux processus physiologiques, parmi lesquels le métabolisme des nutriments absorbés et la dégradation des composés xénobiotiques.

En tant qu'organe spécialisé dans la détoxification métabolique des agents toxiques, le foie devient une cible privilégiée de l'accumulation de ceux-ci, et peut subir de ce fait, une altération carcinogène ou mutagène (Bud *et al.*, 2008; Dias da Silva *et al.*, 2017). Le cancer du foie est la deuxième cause de décès liés au cancer, dont un nombre alarmant de nouveaux cas est dépisté chaque année (Shah *et al.*, 2019).

Contrairement à la chimiothérapie ou la radiothérapie à effets secondaires, la recherche moderne se focalise sur les principes actifs des phyto-composés hautement sélectifs et à toxicité réduite pour tuer les cellules cancéreuses (Kim *et al.*, 2019).

HepG2 est la lignée cellulaire d'hépatome humain la plus utilisée dans la recherche pharmaco-toxicologique, notamment pour les études sur l'hépatotoxicité. Bien que ses fonctions métaboliques soient plus limitées que celles des hépatocytes primaires, cette lignée offre des avantages pour les études *in vitro*, tels qu'une durée de vie presque illimitée, une manipulation facile, une disponibilité élevée et un phénotype stable indépendant des caractéristiques du donneur (Donato *et al.*, 2015).

III.4.5.1. Effet des métabolites de nopals sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode de réduction du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)

La figure 17 présente l'effet d'exposition des cellules de la lignée hépatique cancéreuse HepG2 aux polyphénols, caroténoïdes, alcaloïdes et bétalaïnes des jeunes cladodes de l'*Opuntia* de Tissemsilt-Algérie. On n'a observé aucun effet cytotoxique significatif ($p > 0.05$) de ces extraits sur les HepG2 par rapport au contrôle, à des concentrations de 0.25, 0.5 et 1 mg/mL. La comparaison entre la cytotoxicité des extraits a ainsi abouti à l'absence de différence significative entre eux, à l'exception de l'écart significatif ($p < 0.05$) entre les polyphénols à effet promoteur de prolifération (un max de 104.78 ± 4.36) et les caroténoïdes à effet cytotoxique (un minimum de 97.27 ± 5.74).

Si on classe les extraits par force croissante de cytotoxicité, on trouve l'agencement suivant : caroténoïdes > bétalaïnes > alcaloïdes > polyphénols. On a constaté aussi que le changement de concentration n'a aucune conséquence significative sur la cytotoxicité à $p < 0.05$.

En concordance avec nos résultats, les tests initiaux de Tsafantakis *et al.* (2019) ont montré qu'aucun des extraits de cladodes d'*Opuntia* grec ne diminuait de manière significative la viabilité des cellules HepG2 après 24 h de traitement à des concentrations allant jusqu'à 2.5

mg/mL. De même, les valeurs IC50 correspondantes aux extraits de fruits d'*O. dillenii*, étaient supérieures à la dose maximale de 0.5 mg/mL testée, et n'indiquent aucune toxicité significative contre les cellules cancéreuses hépatiques après 72 h d'incubation (Katanić *et al.*, 2019).

Cette non-cytotoxicité observée avec nos extraits de nopals d'*Opuntia*, a été aussi rapportée par De Santiago *et al.* (2019) qui n'ont décelé aucune activité cytotoxique des extraits de cladodes crus et cuits ou encore fermentés à 10 et 20% envers les cellules HT29.

Par ailleurs, dans la recherche réalisée par Alves *et al.* (2016), aucun extrait des cladodes de différents *Opuntia* brésiliens, y compris *O. ficus indica*, n'a montré de cytotoxicité contre les lignées cellulaires utilisées. Ces chercheurs considèrent comme inefficace une inhibition inférieure à 50% de la croissance de ces cellules tumorales.

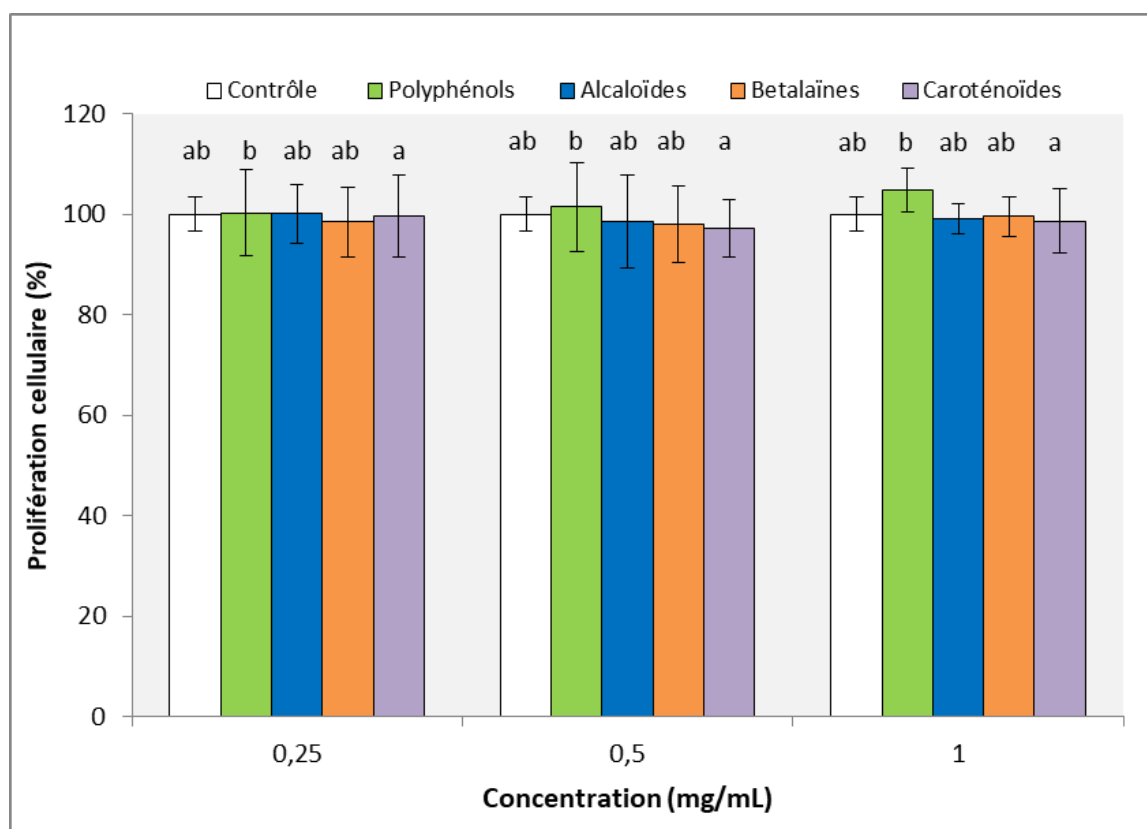


Figure 17 : Effet cytotoxique des polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes de nopals de *Opuntia* d'Algérie, utilisés aux concentrations de 0.25, 0.5 et 1 mg/mL, sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode de réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT). Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.

Dans une étude similaire, **Tsafantakis et al. (2019)** constatent que les extraits phénoliques de cladodes d'*Opuntia* induisent une prolifération de 110% de la charge cellulaire initiale (cellules tumorales). L'extrait d'acétate d'éthyle des fruits d'*Opuntia dillenii*, a conduit vers une prolifération additionnelle au-delà de celle du contrôle estimée à 140% (**Katanić et al., 2019**). La bétanine, utilisée dans une plage de concentrations allant de 2 à 500 μM n'a pas réduit de manière significative la viabilité des cellules cancéreuses Caco-2 ; cette viabilité ne descend pas sous les 90% après 24 h d'incubation avec la dose la plus élevée (**Zielińska-Przyjemska et al., 2016**). Parmi les alcaloïdes étudiés par **Menezes et al. (2016)**, certains comme la glaucine et la xylopinine n'ont aucun effet cytotoxique sur les cellules hépatiques cancéreuses HepG2 aux concentrations maximales de 25 $\mu\text{g/mL}$.

L'extrait de caroténoïdes d'une autre plante, testé à un intervalle entre 6 et 100 μM , n'a été significativement toxique vis-à-vis des cellules HepG2 qu'à des doses dépassant les 75 μM (**Mayer et al., 2020**). Le caractère hydrophobe des caroténoïdes de nopals pourrait être responsable de la toxicité exprimée vis-à-vis des cellules cancéreuses. En comparant la cytotoxicité de deux médicaments, **Dias da Silva et al. (2017)** suggèrent que le médicament le plus lipophile a une capacité plus élevée à traverser les membranes cytoplasmique et mitochondriale et à atteindre, par conséquent, des concentrations plus élevées au niveau des cibles intracellulaires. De plus, l'hydrophobicité impacte également le métabolisme et l'élimination de la molécule, augmentant éventuellement son séjour à l'intérieur de la cellule et sa disponibilité à exercer une toxicité.

Le faible taux des molécules à effet anticancéreux, accompagné de la présence probable de nutriments et l'impact antioxydant prouvé pour les extraits de nopals, maintiennent ou améliorent éventuellement la prolifération remarquée pour les HepG2. **Katanić et al. (2019)** expliquent que les cellules du foie ont pu croître plus rapidement en présence de faibles doses d'extraits. Ces chercheurs argumentent leur résultat par la réalité que les cellules cancéreuses prolifèrent activement, et la présence de nutriments en combinaison avec de faibles niveaux d'antioxydants peut avoir un effet positif additionnel sur la croissance cellulaire. Par ailleurs, **Izuegbuna et al. (2019)** interprètent la non cytotoxicité des cladodes d'*O. stricta* contre la lignée cellulaire U937 par les teneurs insuffisantes de composés phytochimiques dans les extraits.

Katanić et al. (2019) observent que l'effet cytotoxique des extraits de fruits d'*O. dillenii* vis-à-vis de cellules tumorales HepG2 s'améliore avec l'accroissement de concentration de 0.1 à 0.5 mg/mL . **Keller et al. (2015)** ont dû multiplier par 10 la concentration de poudre de cladodes

d'*O. ficus indica* sans effet pour obtenir une inhibition de la croissance de cellules prénéoplasiques du colon.

Par ailleurs, la méthode, le protocole et le type de cellules utilisés conditionnent les mesures de la cytotoxicité dans les cellules de mammifères cultivées (Arbo *et al.*, 2016). Kim *et al.* (2013) ont étudié l'activité anticancéreuse d'extraits de cladodes d'*O. Humifusa* et ont rapporté une inhibition de la croissance de 80.2% pour les cellules SW480 (cancer du col de l'utérus) et de 54.4% pour les cellules MCF7 (cancer du sein). Ces chercheurs rapportent des différences d'activité anticancéreuse entre les différents extraits (hexane, acétate d'éthyle, acétone, méthanol et méthanol/eau), les différentes concentrations (6.25, 12.5, 25, 50 et 100 µg/mL) et la durée du test (24, 48 et 72h). Aussi, aucune action cytotoxique en test MTT (méthode de réduction du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) sur la lignée cellulaire U937, n'a été rapportée par Izuegbuna *et al.* (2019) pour les extraits alcoolique et aqueux de cladodes d'*O. stricta*, à l'opposé de l'extrait acétonique qui a présenté une certaine activité avec une IC50 de 110.1 µg/mL.

Les tests de viabilité ne mesurent qu'un aspect du dysfonctionnement cellulaire mais n'indiquent pas directement la capacité de survie des cellules (Fellows et O'Donovan, 2007). Le test MTT mesure l'activité de l'enzyme de la membrane mitochondriale interne ; la succinate déshydrogénase. Cette enzyme mitochondriale est sensible aux changements locaux des concentrations et flux ioniques (Putnam *et al.*, 2002). Cependant, ce test n'est probablement pas le meilleur choix pour évaluer la cytotoxicité des molécules qui modifient la concentration ionique et induisent, par conséquent, l'activité métabolique cellulaire. Cette dernière s'exprime par l'augmentation de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale, reflétant une pseudo-prolifération cellulaire (Putnam *et al.*, 2002; Arbo *et al.*, 2016).

On peut se baser sur ces constatations pour supposer que les extraits de nopals à leur état naturel suscitent le métabolisme des HepG2, d'où la hausse des taux de succinate déshydrogénase reflétant une prolifération plus importante en présence de ces extraits. Le MTT reste quand même un bon marqueur du dysfonctionnement mitochondrial (Arbo *et al.*, 2016). On peut déduire alors, que les métabolites secondaires de nopals à leur état brut n'ont aucun effet délétère sur les mitochondries des cellules HepG2.

La variation corrélée à la plante demeure un autre volet de fluctuation de l'effet cytotoxique contre les cellules cancéreuses. Selon Alves *et al.* (2016), les différences inter-variétales et inter-stations d'échantillonnage régissent l'activité cytotoxique des extraits. La

sensibilité des cellules cancéreuses aux extraits de fruits des différentes variétés de ce cactus diffère selon les types de cellules (Chavez-Santoscoy *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2016). Parmi les différentes poudres de cladodes testées par Keller *et al.* (2015), celle d'*O. ficus indica* était la moins efficace dans la protection des cellules normales du colon contre la mort cellulaire induite par 40µM de 4-hydroxynonéol (HNE), un produit fini de la lipooxydation à effet cytotoxique. En revanche, cette poudre n'a affiché aucun effet significatif sur la viabilité des cellules préneoplasiques du colon.

Alves *et al.* (2016) concluent que les extraits des cladodes prélevés dans la saison pluvieuse sont plus efficaces que ceux de la saison sèche contre les lignées cancéreuses du colorectum humain (HCT-116) et du glioblastome humain (SF-295), avec une inhibition de prolifération de l'ordre de 18-23% et 10-20%, respectivement. Le contraire est remarqué pour la lignée de l'ovaire humain (OVCAR-8), avec 7.5% pour les cladodes de la saison sèche contre 5% de la saison pluvieuse.

La particularité des cellules cancéreuses employées est un autre facteur déterminant de l'influence cytotoxique des extraits analysés. Parmi les lignées cancéreuses testées par différents jus de fruits d'*Opuntia*, la viabilité des cellules cancéreuses hépatiques était moins affectée que les cellules de la prostate et du côlon (Chavez-Santoscoy *et al.*, 2009). Comparés aux lignées du côlon (LoVo) et du sein (MCF-7), les cellules cancéreuses humaines dérivées du foie (HepG2) étaient les plus résistantes aux différents extraits de chair, graines et peau de fruit d'*Opuntia* (0.1 à 0.5 mg/mL) (Katanić *et al.*, 2019).

Ces différences sont attribuées par Gerets *et al.* (2012) et Staack *et al.* (2002) à l'origine du modèle cellulaire (animal, humain), aux procédures de leur obtention (cellules immortalisées ou cellules primaires), mais aussi à l'activité distincte de biotransformation des métabolites dans les différents modèles hépatiques.

III.4.5.2. Effet des métabolites de nopals sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode d'inclusion lysosomale du rouge neutre

Le test NR (rouge neutre) s'appuie sur le stockage du colorant rouge neutre dans les lysosomes et l'appareil de Golgi, dont tout dommage diminue cette accumulation (Arbo *et al.*, 2016). L'inhibition de la prolifération des hépatocytes cancéreux, basée sur la technique d'absorption du rouge neutre NR, était non significative ($p > 0.05$) pour tous les extraits. A l'égard des caroténoïdes agissant d'une manière inversement proportionnelle à la concentration, aucune relation de dose-dépendance n'a été observée pour le reste des extraits (fig.18).

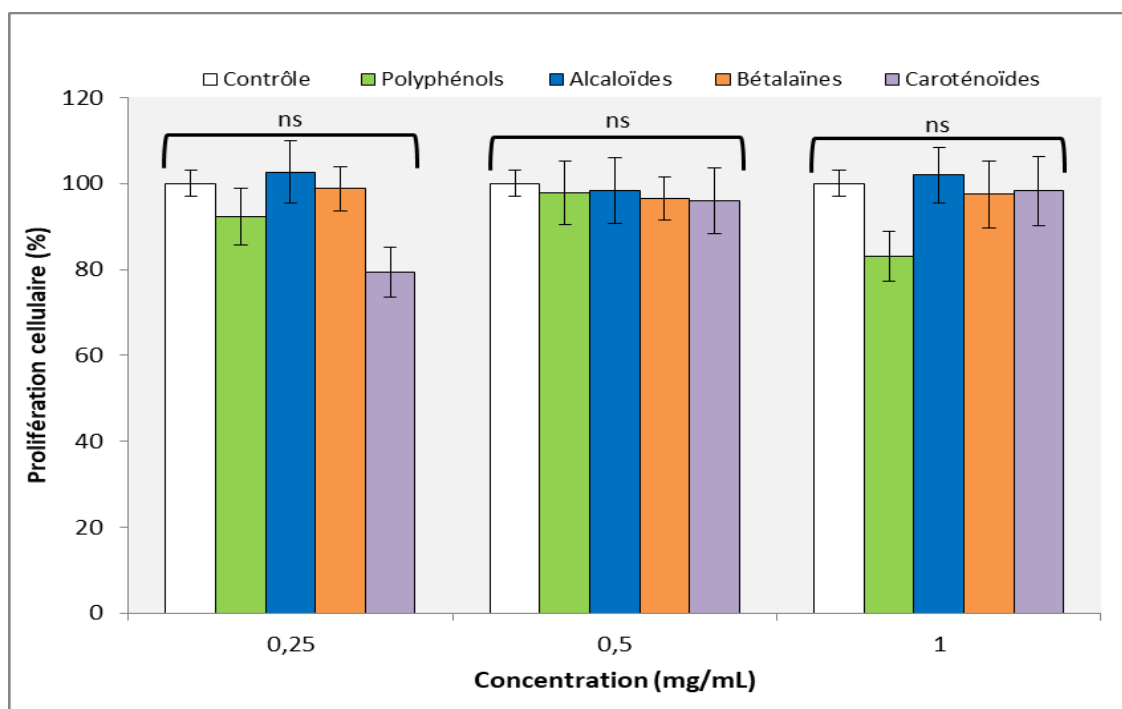


Figure 18: Effet cytotoxique (en % de prolifération cellulaire) de différentes concentrations (0.25, 0.5 et 1 mg/mL) en polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et en alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode d'inclusion lysosomale du rouge neutre. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures, ns: non significatif par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.

L'absence de proportionnalité entre la concentration et la réponse nous empêche de calculer et comparer les EC50 des quatre extraits de nopals, et nous oblige de choisir les effets moyens et les effets maximaux pour réaliser cette comparaison.

Comme le montre le tableau 13, la moyenne de cytotoxicité induite dans les lysosomes par les polyphénols, les bétalaïnes et les caroténoïdes pour les cellules tumorales HepG2 est inférieure à celle nécessaire pour endommager les mitochondries. Le contraire a été remarqué pour les alcaloïdes, qui favorisent la dégradation des mitochondries au dépend des lysosomes.

En comparant la cytotoxicité maximale des quatre extraits pour les tests MTT et NR, on trouve une amélioration cytotoxique respective dans ce dernier touchant 18.45, 18.11, 1.64 et 0.22% pour les caroténoïdes, polyphénols, bétalaïnes et alcaloïdes. La comparaison de ces deux paramètres classe ces métabolites selon leur cytotoxicité croissante comme suit : polyphénols, caroténoïdes, bétalaïnes et alcaloïdes.

Les composés phénoliques de l'étude de **Bacanli et al. (2017)**, ont montré un profil cytotoxique NR légèrement supérieur (IC50 sont significativement plus bas) à celui du MTT. Le

caroténoïde crocin s'est révélé plus cytotoxique envers le test du rouge neutre (IC50= 2.75 mg/mL) qu'envers le test MTT (IC50=3.25 mg/mL) après 48h (Noureini *et al.*, 2012). La similitude entre les tests MTT et NR est aussi observée pour la fraction alcaloïdique analysée par Kakrani *et al.* (2018).

Le dosage du chlorhydrate de 3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine appelé également « la captation du rouge neutre », est une estimation quantitative de la viabilité d'une culture cellulaire (Repetto *et al.*, 2008). Il mesure la capacité des cellules vivantes à incorporer ce colorant faiblement cationique qui pénètre et se concentre dans les lysosomes par diffusion passive non ionique. Une fois dans le lysosome à pH inférieur à celui du cytoplasme, le gradient de pH le charge pour qu'il se lie aux groupes anioniques et/ou phosphate de la matrice lysosomale par des liaisons électrostatiques hydrophobes (Winckler, 1974; Nemes *et al.*, 1979).

En réalité, la quantité de colorant retenue est dépendante du nombre de cellules viables, puisque la rétention du colorant est perdue par mort cellulaire ou réduction du gradient pH suite à une altération des membranes lysosomales (Filman *et al.*, 1975; Bitensky, 2008). L'intégrité lysosomale liée en concomitance au rouge neutre, est un indicateur très sensible de la viabilité cellulaire (Repetto *et al.*, 2008).

Nous utilisons plusieurs tests de mesure de la viabilité cellulaire in vitro dans le but d'augmenter la fiabilité des résultats obtenus. Les dosages MTT et NR sont les plus sensibles dans la détection des événements cytotoxiques (Fotakis et Timbrell, 2006).

Tableau 13: Comparaison des effets cytotoxiques moyens et maximaux des quatre extraits de nopals pour les tests MTT et NR

Métabolite	Cytotoxicité moyenne			Cytotoxicité maximale		
	MTT	NR	Différence %	MTT	NR	Différence %
polyphénols	102.19	91.07	+ 12.21	97.27	79.32	+18.11
Alcaloïdes	99.27	100.99	- 1.70	98.11	96.5	+0.22
Bétalaïnes	98.73	97.58	+ 1.16	98.59	98.33	+1.64
Caroténoïdes	98.53	91.18	+ 7.46	101.45	83.07	+18.45

Le signe + indique un avantage pour le test NR, les signe – indique un avantage pour le test MTT.

Le test NR confirme l'absence d'effet des extraits de nopals sur la lignée cancéreuse HepG2 notée dans le test précédent MTT. Cependant, la comparaison des résultats obtenus pour la viabilité cellulaire par la réduction de MTT et l'absorption de NR, va fournir des informations sur la sensibilité relative des organites cibles après exposition des cellules aux extraits de nopals d'*Opuntia* d'Algérie (Dias da Silva *et al.*, 2019). Les lysosomes sont donc plus sensibles que les mitochondries vis-à-vis des polyphénols, caroténoïdes et bétalaïnes de nopals d'*O. ficus indica*, dans un temps où les alcaloïdes de ce cactus affectent les mitochondries plus que les lysosomes.

La valeur IC₅₀ considérée comme critère d'efficacité cytotoxique est de 30 µg/mL pour les extraits de plantes non purifiés et 20 µg / mL pour un extrait pur (Suffness et Pezzuto, 1990). Pour le matériel végétal comestible, les critères proposés sont IC₅₀ <50 µg/mL (Cytotoxicité significative ou forte), 50 µg/mL <IC₅₀ <200 µg/mL (cytotoxicité modérée), 200 µg/mL <IC₅₀ <1000 µg/mL (cytotoxicité faible), IC₅₀> 1000 µg/mL (pas de cytotoxicité) (Kuethe et Efferth, 2015).

III.4.5.3. Effet des métabolites de nopals sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 après inhibition du cytochrome P450

Pour estimer le rôle des principales enzymes CYP450 impliquées dans le métabolisme des polyphénols, caroténoïdes, alcaloïdes et bétalaïnes des nopals dans l'hépatotoxicité, les HepG2 ont été incubées avec des inhibiteurs spécifiques de différentes isoformes de cette enzyme, à savoir la métyrapone (inhibiteur du CYP2E1) et la quinidine (inhibiteur du CYP2D6).

La figure 19 présente la concentration-réponse obtenue après la co-incubation des HepG2 avec chaque métabolite secondaire de nopals et des inhibiteurs du CYP450. Globalement, aucune influence significative ($p>0.05$) n'a été enregistrée entre les concentrations des extraits pour les deux tests d'inhibition de CYP.

En outre, il n'y avait aucune différence significative ($p>0.05$) entre les extraits et le contrôle ($p>0.05$) après blocage du CYP2D6 par la quinidine. Le métabolisme des quatre extraits est indépendant de cette forme de CYP. Toutefois, il est utile de signaler que la plus haute diminution de prolifération des HepG2 a été 49.33% pour la dose 0.25mg/mL de caroténoïdes après blocage de CYP2D6. Par conversion de ce pourcentage, on trouve une réduction de 1.9 fois pour ce métabolite à cette dose par rapport au contrôle.

En revanche, le nombre de cellules cancéreuses viables a connu une chute substantielle ($p<0.05$) donnant une viabilité minimale de $50.77\pm 6.51\%$, suite à l'ajout des caroténoïdes de

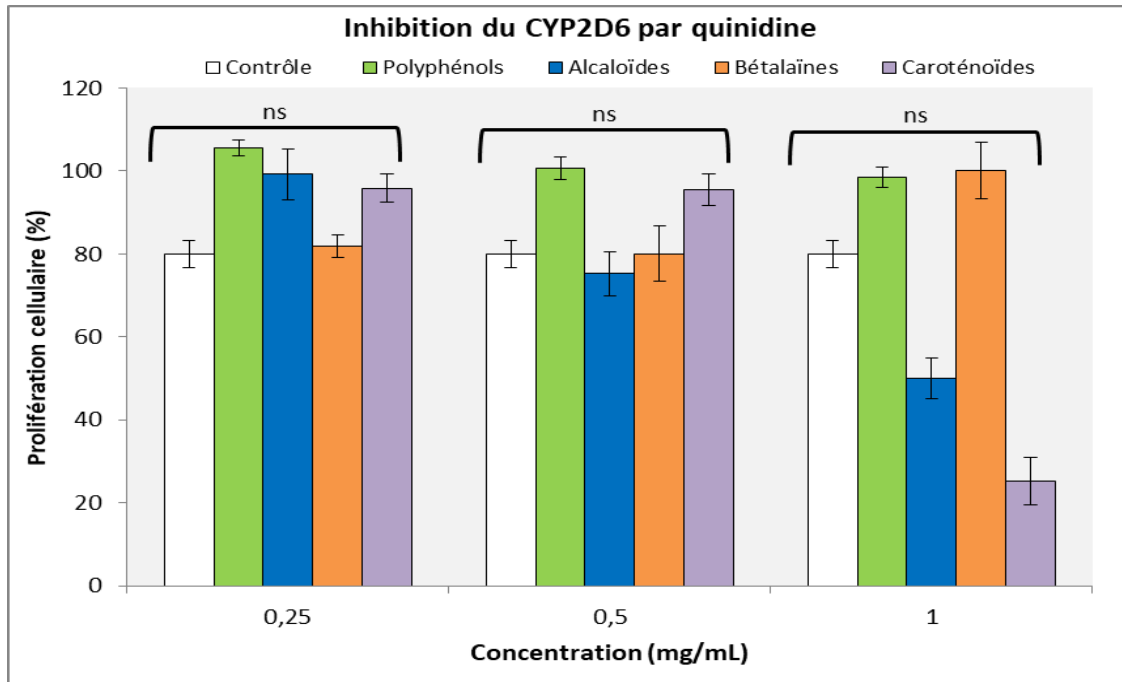
nopals après inhibition de l'isoforme CYP2E1 par la métyrapone, ce qui reflète une dépendance probable du métabolisme de cette classe à l'activité de cette enzyme. Les extraits restants n'ont donné aucune activité anticancéreuse significative ($p > 0.05$) par inhibition de cette isoforme.

La comparaison statistique de l'effet cytotoxique des extraits de nopals sur les cellules HepG2 avant (test MTT) et après inhibition des CYP (CYP2D6 et CYP2E1), a révélé une absence totale de différence significative d'action pour tous les extraits, à l'exception de l'écart significatif des caroténoïdes ($p < 0.05$) entre les HepG2 sans inhibition des CYP et après inhibition de l'isoforme CYP2E1. Il est quand même intéressant de parler de l'effet cytotoxique positif, malgré non significatif ($p > 0.05$) des caroténoïdes après suppression du CYP2D6. Les alcaloïdes et les bétalaïnes sont ainsi plus actifs dans ce dernier cas qu'après l'inhibition des CYP2E1.

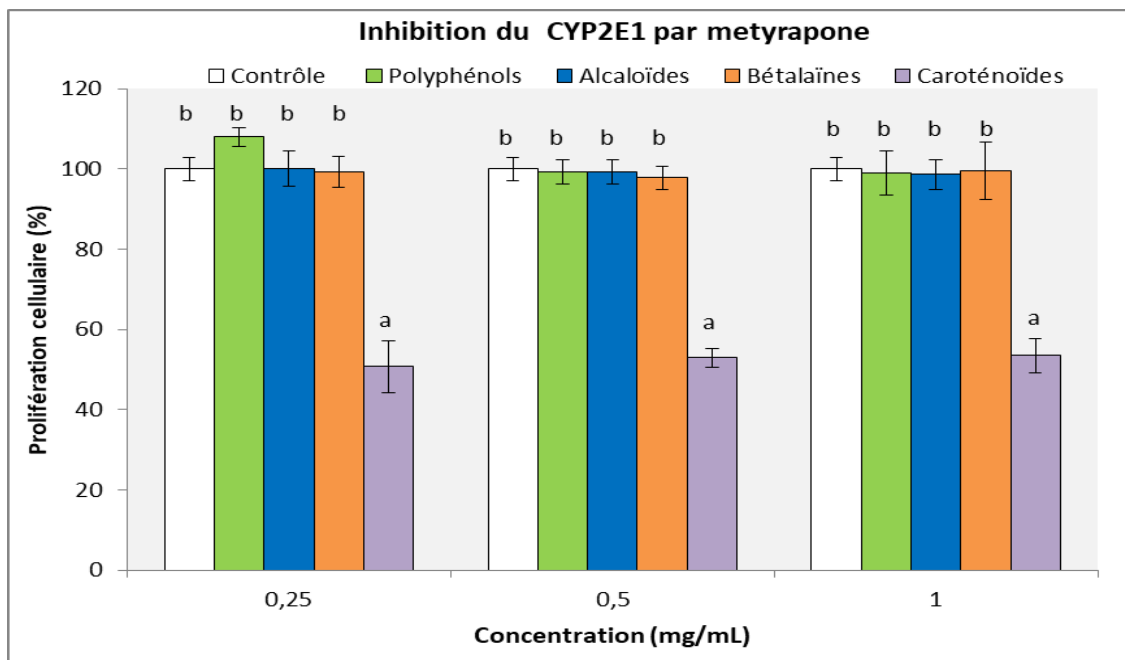
Les enzymes du cytochrome P450 sont impliquées dans la phase I du métabolisme des xénobiotiques, notamment des médicaments, des polluants environnementaux et des produits diététiques (**Basheer et Kerem, 2015**). Les P450 peuvent catalyser de nombreuses réactions à l'exemple de l'hydroxylation, l'époxydation, l'oxygénation, la désalkylation, la décarboxylation, le clivage de la liaison C-C et l'ouverture du cycle (**Bak et al., 2011; Guengerich et Munro, 2013**). La réduction, le réarrangement et l'isomérisation sont des réactions inhabituelles catalysées par cette famille enzymatique (**Korobkova, 2015**).

Les produits métaboliques des P450 sont plus solubles dans l'eau et deviennent disponibles pour les enzymes de phase II, qui accroissent encore leur solubilité en vue de leur élimination (**Basheer et Kerem, 2015**). La facilitation d'excrétion de ces métabolites polaires participe à la détoxification des xénobiotiques indésirables (**Korobkova, 2015**).

Le nombre et la fonctionnalité des CYP sont des atouts majeurs lors de la métabolisation des extraits de nopals par les HepG2. Il est à signaler qu'il y a une limitation de présence de ces enzymes CYP dans ces cellules cancéreuses par rapport à la situation in vivo (**Guo et al. 2011; Lin et al. 2012**). Les isoformes les plus importantes du cytochrome P450, telles que CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6 ou CYP2D6, sont appelées dans la réaction d'oxydation lors de la phase I de métabolisation dans le foie. Elles sont absentes ou à peine détectables dans les cellules HepG2 (**Guo et al., 2011**). Malgré cette pénurie d'enzymes CYP, les cellules HepG2 présentent une activité CYP considérable impliquée simultanément dans l'activation métabolique et l'inactivation de nombreux médicaments et composés environnementaux (**Donato et al., 2008; Lin et al., 2012**).



A



B

Figure 19: Effet cytotoxique (en % de prolifération cellulaire) de différentes concentrations (0.25, 0.5 et 1 mg/mL) de polyphénols, caroténoïdes, bétalaines bétalaines et d'alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie sur la viabilité des cellules tumorales HepG2 par la méthode de réduction du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) après inhibition des A) cytochromes CYP2D6 par la quinidine et B) CYP2E1 par la metyrapone. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%, ns: non significatif par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.

Ces P450 peuvent métaboliser les polyphénols, y compris les flavonoïdes, les acides phénoliques et les phénols alcools (**Basheer et Kerem, 2015**). Les flavonoïdes sont des substrats pour diverses enzymes hépatiques P450 qui les hydroxylent et/ou o-déméthylent avant leur élimination (**Zhou et al., 2003**). **Korobkova (2015)** démontrent que les enzymes CYP participent au métabolisme des vitamines liposolubles, ce qui rappelle la possibilité de métaboliser leurs précurseurs caroténoïdes. Les alcaloïdes de pyrrolizidineAP subissent une bioactivation métabolique par les cytochromes P450 (CYP), en particulier l'isozyme CYP3A (**Neuman et al., 2015**).

Ces enzymes sélectives sont capables de lier et métaboliser des substrats de forme, taille et propriétés chimiques différentes (**Basheer et Kerem, 2015**). Selon ces auteurs, leurs résultats ont démontré l'importance de l'hydrophobicité, de la stéréostructure et du poids moléculaire des ligands pour s'interagir avec les P450.

Dans cette optique, on pense que l'inefficacité des polyphénols et bétalaïnes en présence et en absence d'inhibiteurs de CYP provient de leur métabolisation par d'autres isoformes. Entre autre, le manque d'hydrophobicité de ces classes est responsable de l'infériorité d'effet marquée par rapport aux caroténoïdes, en empêchant leur entrée aux cellules HepG2 et en facilitant leur élimination.

Par ailleurs, l'absence de cytotoxicité des caroténoïdes en présence des isoformes CYP comparé à leur inhibition, est causée par leur métabolisation par ces enzymes suite à l'affinité résultante de la lipophilie de ces phytomolécules. Au-delà, ces isoformes CYP, hautement exprimées dans les cellules normales, laissent penser que celles-ci seront épargnées de l'effet pro-oxydant ou cytotoxique de cet extrait.

La toxicité des caroténoïdes après inhibition de CYP pourrait être attribuée à leur entrée dans la cellule par des voies alternatives moins efficaces en dégradation, ou conduisant vers des métabolites plus toxiques aux HepG2 que ceux issus des isoformes CYP2D6 ou CYP2E1. En plus, il est très plausible de présumer que le métabolisme médié par le CYP450 a un effet détoxifiant pour la lignée HePG2. **Zanger et Schwab (2013)** ont montré que lorsque le CYP2D6 ou le CYP2E1 sont inhibés, des voies alternatives peuvent assurer la biotransformation.

En outre, la différence des résultats de cytotoxicité observés entre les quatre métabolites secondaires des nopals d'Algérie, peut être expliquée par leur complexation ou interaction au niveau du récepteur ou transporteur, et la modification de leur absorption par l'hépatocyte (**Tu et al., 2013**). À cela s'ajoute la pertinence métabolique différente de chaque isoforme CYP450 pour

chaque molécule ; où certains sont métabolisés davantage par le CYP2D6 que d'autres (**Antia et al., 2009**). Des études menées par **Bedada et al. (2018)** ont établi que certains extraits de plantes peuvent agir à la fois comme substrat et inhibiteur compétitif du CYP2D6.

Outre la différence d'expression du CYP, d'autres caractéristiques comme la croissance continue et la durée de vie presque illimitée, s'ajoutent aux cellules par processus d'immortalisation. Ces nouvelles caractéristiques peuvent induire des réponses physiologiques différentes par rapport aux cellules normales (**Dias da Silva et al., 2015**).

Les cellules HepG2 sont capables de limiter les effets des molécules de nopals en les conjuguant par les enzymes glutathion S-transférase (GST). Bien que l'expression des enzymes GST, conjointement aux CYP, est aussi faible dans les cellules HepG2 que dans les hépatocytes primaires ou le foie humain, la conjugaison du glutathion réduit à des composés électrophiles est l'une des réactions de phase II de détoxification les mieux conservées dans cette lignée cellulaire (**Donato et al., 2008; Guo et al., 2011**). Les cellules HepG2 connaissent des niveaux relativement élevés de certaines enzymes GST, à savoir GSTA4, GSTM2 ou GSTT1 (**Guo et al., 2011**). Les spécificités distinctes de ces GST aux substrats xénobiotiques ou endogènes a été proposé par **Guo et al. (2011)**, et est pointée ici pour expliquer en partie l'action contrastée des quatre extraits de nopals sur les cellules HepG2.

Un autre paramètre très pertinent, est la sous-expression des transporteurs de cations organiques (OCT), au rôle d'absorption dans la membrane basolatérale des cellules hépatiques immortalisées (**Tu et al., 2013**). Le manque de ces OCT dans les HepG2 pourrait expliquer partiellement la non cytotoxicité des extraits de nopals, suite à un manque d'administration par l'hépatocyte (**Dias da Silva et al., 2015**).

III.4.5.4. Influence des métabolites de nopals sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NOS) par les cellules tumorales HepG2

L'analyse de la figure 20 démontre que la génération d'intermédiaires réactifs RNS / ROS a été inversement favorisée par la concentration croissante des quatre extraits de nopals. Dans ce modèle cellulaire in vitro, les caroténoïdes étaient les seuls à inciter une surproduction des espèces réactives comparés au contrôle pour toutes les concentrations utilisées allant à des taux supplémentaires de 41, 25 et 11% pour les doses 0.25, 0.5 et 1 mg/mL, respectivement.

Les alcaloïdes font de même avec un maximum de 49% pour la plus faible concentration (0.25mg/mL), alors que les doses 0.5 et 1 mg/mL ont donné des taux égaux ou faibles par

rapport au contrôle. Les bêtaïnes et polyphénols n'ont abouti à aucun effet pro-oxydant car seuls des taux égaux ou plus bas d'espèces réactives ont été constatés comparativement aux cellules sans extraits.

La production des espèces réactives est significativement ($p < 0.05$) plus prononcée à la dose 0.25mg/mL que la dose 1mg/mL. De même, les caroténoïdes sont des pro-oxydants intéressants par rapport aux polyphénols et bêtaïnes ($p < 0.05$).

Récemment, les recherches scientifiques apprécient le double rôle des ROS dans le cancer. D'une part, ces ROS favorisent la signalisation pro-tumorigène, facilitent la prolifération, la survie, l'angiogenèse et la métastase ainsi que l'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie (Sabharwal et Schumacker 2014) ; et d'autre part, ils stimulent la signalisation anti-tumorigène et induisent la mort des cellules cancéreuses par le stress oxydatif (Reczek et Chandel, 2017).

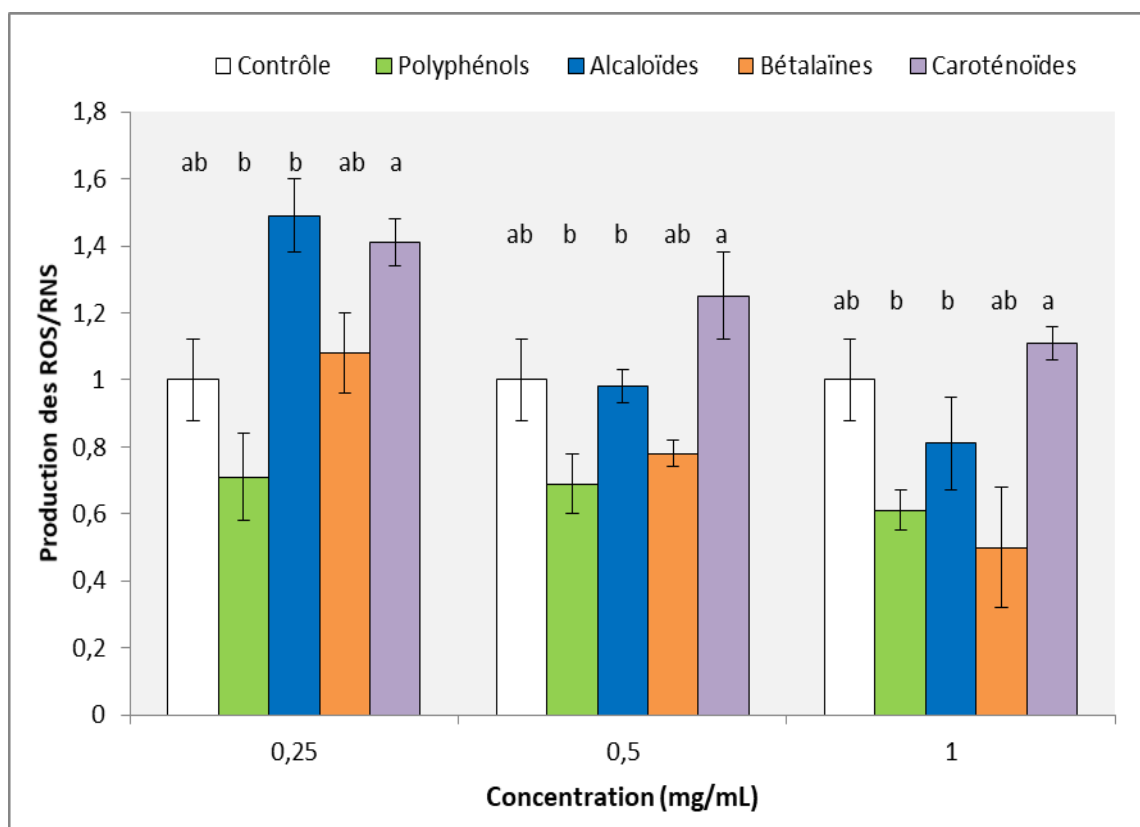


Figure 20: Influence des polyphénols, caroténoïdes, bêtaïnes et alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* Algérien, utilisés en concentrations (0.25, 0.5 et 1 mg/mL) sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NOS) par les cellules tumorales HepG2 (Les résultats sont la moyenne \pm SD de trois mesures, les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%).

Comparées aux cellules normales, les cellules cancéreuses hyperactivent la signalisation nécessaire à la transformation cellulaire et à la tumorigenèse par augmentation de la production de ROS. Parallèlement, elles maintiennent l'homéostasie ROS par élévation de leur capacité antioxydante afin d'échapper à la mort cellulaire (**Kim et al., 2019**). Cette modification de l'environnement redox peut augmenter la vulnérabilité des cellules cancéreuses aux thérapies de manipulation ROS. Par conséquent, les stratégies qui ciblent l'élimination des ROS au-dessous de l'exigence minimale, ou leur surproduction au-delà de la capacité antioxydante des cellules cancéreuses peuvent potentiellement être des approches thérapeutiques efficaces contre le cancer (**Reczek et Chandel, 2017**).

Compte tenu des niveaux plus élevés de ROS dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales, le traitement pro-oxydant du cancer par lequel on augmente la production de ROS, ou on diminue leur piégeage par inhibition ou épuisement des pools antioxydants cellulaires (GSH, TRX, TR, SOD1 et CAT), peut pousser les cellules cancéreuses au-dessus de leur limite tout en épargnant les cellules normales (**Weinberg et Chandel, 2015; Reczek et Chandel, 2017**). Cependant, l'identification et le ciblage des voies anti-oxydantes utilisées sélectivement par les cellules cancéreuses pour maintenir l'équilibre redox est d'une importance majeure (**Reczek et Chandel, 2017**).

Les métabolites secondaires de nopals agissent d'une manière différente sur la production des espèces réactives par les cellules hépatiques cancéreuses. Il faut garder à l'esprit que les composés phytochimiques peuvent agir en anti/pro-oxydants en fonction de leurs doses, du type de cellule, du temps d'exposition et de l'environnement dans lequel ils se trouvent (**Sznarkowska et al., 2017**). Cependant, ce mécanisme du double comportement protecteur/destructeur n'est pas exactement connu (**Kocyigit et al., 2018**).

Dans ce test, l'effet antioxydant des extraits est très flagrant suite à la linéarité négative entre la concentration et les taux des ROS et RNS enregistrés. La neutralisation de ces espèces réactives par les polyphénols et bêtaïnes, éclaire la teneur faible des ROS/RNS notée paradoxalement à un accroissement des HepG2 (test MTT). Ce pouvoir antioxydant remarquable est évoqué pour combler la surproduction des ROS/RNS résultante du métabolisme poussé en présence de ces molécules, et protéger les cellules cancéreuses des agressions de ces espèces réactives. La production exacerbée de radicaux libres dérive d'une capacité métabolique plus efficace des cellules (**Dias da Silva et al., 2015**). Les résultats précédents du test MTT confirment cette hyperactivité métabolique des HepG2 en présence des polyphénols de nopals.

L'action anti-oxydante peut devenir oncogène selon **Guzzo et al. (2014)**. **Chandel et Tuveson, (2014)** révèlent que les antioxydants alimentaires qui ne récupèrent pas efficacement le pool de ROS, vont favoriser plutôt la carcinogénèse par abaissement de la toxicité des ROS éloignés de leur site de production. Pour surmonter ce problème, ces auteurs proposent l'utilisation des antioxydants à effet ciblé, qui sont capables d'accéder et détoxifier les ROS proches des sièges de génération. Ces dernières sont les responsables de la signalisation protumorigène.

Les polyphénols et flavonoïdes de nopals connus comme antioxydants tels que la quercétine, les épicatechines et l'épigallocatechine-3-gallate, le kaempférol et l'acide gallique, caféique, chlorogénique et férulique se sont également avérés pro-oxydants dans des modèles cellulaires (**Watjen et al., 2005; Galati et O'brien, 2004**). Or, dans l'étude de **Zielińska-Przyjemska et al. (2016)**, visant à évaluer l'effet de la bétanine sur la production de ROS, ce bétalaïne inhibe considérablement la production de ROS, mais le mécanisme n'est pas encore élucidé. Ce résultat est en accord total avec le nôtre sur les bétalaïnes de nopals. Les bétaxanthines et bétacyanines sont capables de traverser les membranes et d'exercer leur activité antioxydante à l'intérieur des cellules cancéreuses CaCo-2 de $71\pm 13\%$ à $6.2\pm 3.1\%$ et $3.5\pm 1.4\%$, respectivement (**Farabegoli et al., 2017**)

Le blocage de l'activité des CYP enzymes est un autre moyen pour réduire les espèces réactives par les polyphénols et bétalaïnes. **Korobkova, (2015)** corrèle l'inhibition de la génération de ROS à la suppression des activités CYP. Cet auteur montre que les polyphénols modulent l'activité de plusieurs isoformes de CYP par inhibition ou stimulation. La quercitine, kaempferol, isorhamentine, naringénine, naringine, ECCG et ECG ainsi que l'acide caféique et gallique inhibent plusieurs formes de CYP.

Au contraire, l'effet pro-oxydant propre aux autres classes bioactives de nopals ; à savoir les caroténoïdes et alcaloïdes, est une probabilité à prendre en considération pour interpréter la surproduction des espèces réactives. Certains alcaloïdes comme la Piperlongumine, cathachunine et subditine peuvent engendrer une production excessive des ROS (**Habli et al., 2017**).

La production des espèces réactives par stimulation des enzymes CYP semble très logique pour les caroténoïdes et alcaloïdes. Les résultats de l'étude de **Gordon et al. (2000)** démontrent une induction accrue des CYP hépatiques 2E1 en réponse à une exposition à l'alcaloïde rétorsine chez le rat.

Le β -carotène provoque une hyperproduction des ROS (plus de 33fois) préférentiellement dans le foie, en concomitance avec une induction de ses CYP incluant CYP2E1 (Paolini *et al.*, 2001). Zhang et Omaye (2001) ont démontré que la balance antioxydant/pro-oxydant du β -carotène dépend de sa concentration et de la tension d'oxygène.

Selon Siems *et al.* (2002), l'attaque des radicaux libres en surplus dans les HepG2 sur les caroténoïdes comme le β -carotène, entraîne la formation des produits de clivage à effet pro-oxydant envers les organites subcellulaires comme les mitochondries. Cette explication illustre elle aussi l'avantage des caroténoïdes en production des ROS/RNS.

Dans le cas des caroténoïdes et alcaloïdes, on propose un dépassement de la machinerie antioxydante intrinsèque des cellules HepG2 par le sursaut oxydatif provoqué par ces classes de phyto-métabolites. L'excès des ROS/RNS peut conduire vers un épuisement des approvisionnements en GSH couplé à une augmentation concomitante de la forme oxydée ; GSSG (Dias da Silva *et al.*, 2017). Ce GSH est considéré comme la première ligne de défense contre les dommages oxydatifs et la génération de radicaux libres (Dias da Silva *et al.*, 2013b).

Selon Dias da Silva *et al.* (2017), la provocation de stress cellulaire important abouti à l'activation des mécanismes de mort cellulaire, et peut être indiquée comme la cause davantage d'activité cytotoxique notée pour les caroténoïdes en MTT. Les espèces oxydantes réactives non éliminées, interagissant et dégradent oxydativement les biomolécules vitales comme les acides nucléiques, les protéines et les lipides ; ce qui endommage l'intégrité structurelle et fonctionnelle des cellules et les organites (Dias da Silva *et al.*, 2017, 2019).

On peut conclure que la non cytotoxicité des extraits de nopals est argumentée par une surproduction d'espèces réactives n'atteignant pas les taux létaux (cas des caroténoïdes et alcaloïdes), ou une action antioxydante protectrice favorisant l'action pro-cancéreuse au profit des cellules HepG2 (cas des polyphénols et bétalaines). L'avantage des caroténoïdes de nopals par rapport aux autres extraits dans la destruction des cellules HepG2 sort de ce mécanisme pro-oxydant.

III.4.5.5. Effet des métabolites de nopal sur le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$)

Le potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta\psi_m$) en présence et en absence d'extraits de nopals a été évalué afin de déterminer leur capacité de perturbation de la fonction mitochondriale des HepG2, dont la génération d'ATP et l'effet tampon du Ca^{2+} de la cellule.

Sur la figure 21, une dépolarisation mitochondriale significative ($p < 0.05$) a été enregistrée pour tous les extraits de nopals pour les concentrations utilisées. L'inclusion mitochondriale du pigment TMRE, qui reflète l'intégrité et le potentiel membranaire des mitochondries, est abaissée de 72.33% par les polyphénols et les alcaloïdes, 67% par les caroténoïdes et 57.33% par les bétalaïnes. Autrement dit, le $\Delta\psi_m$ est respectivement 3.61, 3.03 et 2.34 fois plus faible que le témoin.

La capacité des polyphénols à induire un dysfonctionnement mitochondrial a été suggérée comme un mécanisme anticancéreux possible par **Storz, (2005)**. De même, une perte modérée du potentiel mitochondrial à la suite du traitement à la bétanine a été observée dans les cellules Caco-2 (**Zielińska-Przyjemska et al., 2016**). Outre le niveau d'ATP cellulaire inférieur, nous avons également confirmé que la mahanine dépolarise le potentiel de membrane mitochondriale (**Roy et al., 2005**). Le bétalaïne indicaxanthine obtenue à partir du fruit d'*O. ficus indica*, a augmenté la dépolarisation des membranes mitochondriales par rapport aux groupes témoins ($13.2 \pm 1.2\%$ contre $8.4 \pm 0.3\%$ respectivement) (**Allegra et al., 2020**).

En comparant les extraits, la dépolarisation la plus élevée a été observée avec 1mg/mL de caroténoïdes (0.25). En revanche, les bétalaïnes à 1 mg/mL ont exercé l'effet le plus faible sur $\Delta\psi_m$ (0.49). Statistiquement, la concentration 0.5mg/mL a été celle qui a le plus perturbé la membrane mitochondriale mais sans apparence significative comparée aux autres concentrations ($p > 0.05$).

Les tests MTT et NR ont mis en évidence le pouvoir que certains extraits de nopals avaient pour améliorer le métabolisme déjà hyperactif des cellules HepG2, tout en privilégiant les lysosomes cibles aux succinate déshydrogénases des mitochondries dans leur action toxique. L'hyperactivité exige une forte production d'ATP conjonctuellement à une haute génération de ROS, qui sera suivie, par conséquent, d'une réduction des taux d'ATP, d'une diminution du potentiel de membrane mitochondriale $\Delta\psi_m$ et de l'apoptose (**Wang et al., 2001**).

Les résultats **d'Abramov et Duchon (2008)** montrent clairement que la dépolarisation mitochondriale passe en deux étapes indiscernables mais à mécanismes distincts. La phase initiale réversible de dépolarisation est une réponse directe à la combinaison d'une panne énergétique et d'une accumulation intra-mitochondriale de calcium. Le déficit énergétique est provoqué par une demande d'énergie accrue et d'un épuisement de substrat mitochondrial, tandis que l'apport calcique est augmenté suite à la perméabilisation de la membrane par les espèces

réactives. Elle est inversée en utilisant des substrats de la mitochondrie ou par chélation du calcium (Abramov et Duchen, 2008).

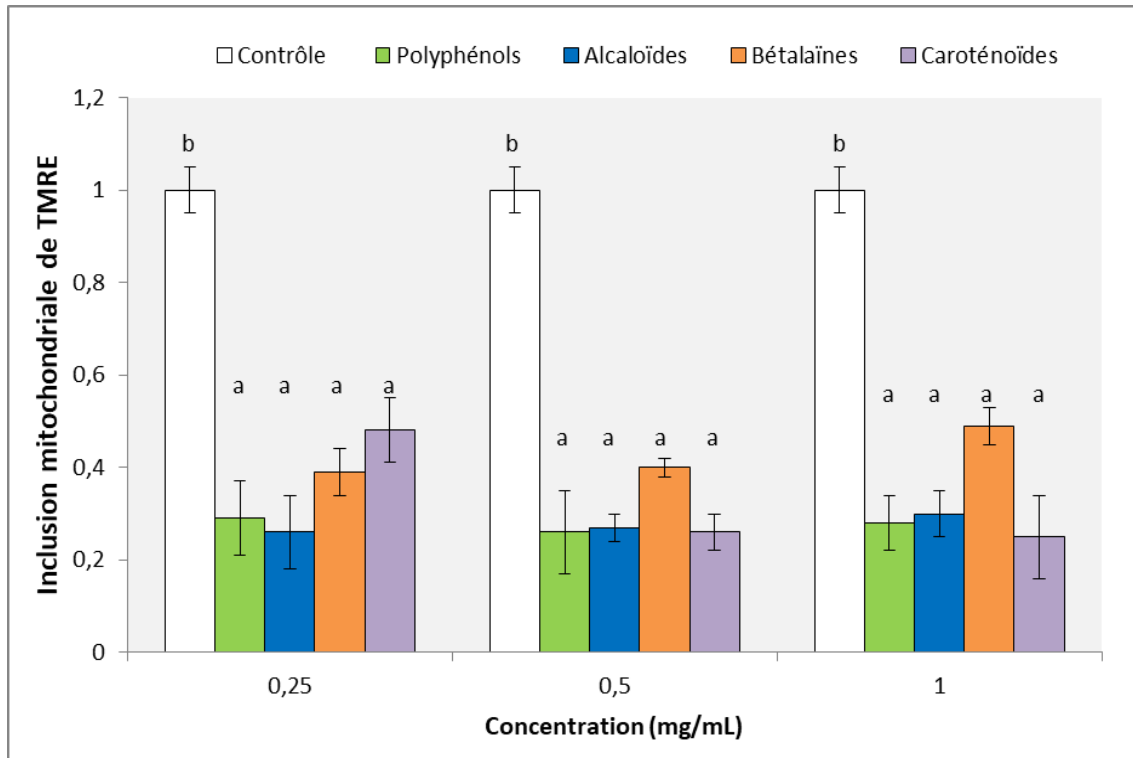


Figure 21: Effet de différentes concentrations (0.25, 0.5 et 1 mg/mL) en polyphénols, caroténoïdes, bétalaines et alcaloïdes de nopals de l'*Opuntia* d'Algérie sur le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) des cellules tumorales HepG2. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois mesures. Les différentes lettres sur les barres (a, b) indiquent une différence significative par comparaison des moyennes selon le test post hoc Tukey au seuil 5%.

La transition vers une perte permanente du potentiel membranaire mitochondrial $\Delta\psi_m$, nommée phase secondaire irréversible, est médiée par l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale mPTP, où elle engage la mort cellulaire (Abramov et Duchen, 2008). L'ouverture du mPTP est favorisée par le calcium, le manque d'ATP, un stress oxydatif ou nitrosatif, ou encore par la perte du $\Delta\psi_m$ dérivant de l'arrêt des pompes à protons suite au freinage de la production d'ATP (Halestrap, 2006; Zorova *et al.*, 2018).

L'ouverture de ce canal à conductance élevée perméabilise la membrane mitochondriale et installe un désordre bioénergétique (Görlach *et al.*, 2015). Le gradient de protons s'équilibre et dépolarise la mitochondrie, la respiration s'inhibe et les ROS se génèrent encore, le Ca^{2+} de la matrice se libère massivement et les mitochondries se gonflent pour fissurer la membrane mitochondriale externe tout en induisant la libération des protéines inter-membranaires et de facteurs pro-apoptotiques (Görlach *et al.*, 2015; Dias da Silva *et al.*, 2017). En vice versa,

l'action de facteurs pro-apoptotiques lyse les mitochondries et mène à des perturbations du gradient de protons de la membrane interne (**Dias da Silva et al., 2017**).

Ce mécanisme de dépolarisation est donné pour expliquer un autre aspect de l'effet des caroténoïdes de nopals vis-à-vis des cellules tumorales HepG2, en tant qu'extrait actif parmi ceux testés dans cette étude. Divers agents pro-oxydants sont capables d'induire l'ouverture de mPTP comme un effet clé pour favoriser la mort cellulaire (**Rasola et Bernardi, 2014**). Cependant, le manque d'ATP suite à la dépolarisation de membrane en présence d'extraits de nopals, laisse penser que la forme de mort cellulaire induite dans cette expérience, par les caroténoïdes surtout, n'implique pas l'apoptose mais plutôt l'autophagie.

L'ATP est essentielle pour exécuter de nombreux processus nécessitant de l'énergie, tels que l'apoptose (**Dias da Silva et al., 2019**). À cet égard, la production d'ATP régie par l'intégrité de mitochondries génératrices d'énergie, est très importante pour induire et propager les signaux de la cascade apoptotique, amenant au clivage des substrats intracellulaires et à des changements morphologiques et biochimiques qui aboutissent à la mort cellulaire (**Dias da Silva et al., 2013a, 2019**).

L'épuisement des réserves énergétiques cellulaires et la formation accrue de ROS/RNS remarqués dans notre étude pour les extraits cytotoxiques, sont des médiateurs importants de l'autophagie d'après **Dias da Silva et al. (2019)**. En plus, la perte de potentiel $\Delta\psi_m$ n'est pas forcément un évènement précoce de l'apoptose, et peut être attribuée à l'autophagie (**Lemasters et al., 1998**). Tout en s'interagissant avec le métabolisme lipidique et glucidique, l'autophagie contribue à la réutilisation des propres constituants cellulaire pour l'énergie, et à l'élimination des biomolécules altérées ou dysfonctionnelles, telles que les protéines, l'ADN et les lipides oxydés irréversiblement (**Singh et Cuervo 2011; Filomeni et al., 2015**).

De ce fait, la mort cellulaire par nécrose est aussi éloignée. Ce troisième mode de mort cellulaire ne suit pas une séquence régulée d'évènements, d'où l'apparition de graves dommages cellulaires ne laissant à la cellule aucun moyen de programmer son suicide (**Dias da Silva et al., 2019**).

Tout de même, il est à prendre en compte que la réponse de la membrane mitochondriale à la lésion toxique, pourrait être spécifique au modèle cellulaire utilisé. **Arbo et al. (2014, 2016)**, ont mis en évidence un effet opposé de la même molécule sur le potentiel membranaire de deux lignées cellulaires testées ; un effet hyperpolarisant sur les neuroblastomes humains SH-SY5Y contre un effet dépolarisant sur les cardiomyoblastes de rat H9c2. La déplétion en ATP la plus

élevée ($p < 0,05$) était concomitante avec une perte de potentiel membranaire $\Delta\psi_m$ la plus élevée pour les hépatocytes primaires de rat (**Dias da Silva *et al.*, 2015**).

Conclusion

Conclusion

Le figuier de barbarie est une plante vasculaire peu exigeante et parfaitement adaptée aux conditions d'aridité extrême et de marginalité absolue. Ses nopals sont gorgés d'essences naturelles et de métabolites secondaires qui protègent la plante mère contre les aléats climatiques, et justifient désormais leur utilisation dans la pharmacopée traditionnelle connue de longue date.

Actuellement, la communauté scientifique est convaincue que la mise en place d'un fond de connaissances consistant est plus qu'indispensable pour s'assurer d'un bon essor d'investissement dans la culture du figuier de barbarie et la production de fruits et de nopals comme produits générateurs d'une valeur économique ajoutée. Cette étude s'oriente alors vers la mise en exergue de la valeur nutraceutique des nopals d'Algérie en vue de les réhabiliter dans un cadre alimentaire et pharmacologique.

Dans cette étude, les résultats de la caractérisation physicochimique et nutritionnelle des nopals ont montré un légume hypocalorique tendre, frais à goût légèrement acide, et une richesse en calcium, potassium, magnésium, vitamine C, fibres et pectines.

La quantification des métabolites secondaires a démontré que les polyphénols sont les plus représentés dans les nopals, suivis des alcaloïdes, des bêtaïnes et des caroténoïdes. L'analyse chromatographique a révélé la présence de l'acide gallique et caféique, la quercitine, la rutine, le kaempférol, la naringénine et la malvine parmi les 57 structures phénoliques identifiées. Des alcaloïdes d'indole, stéroïdes et de pyridine ont été également identifiés.

Sur le plan de l'activité biologique, les extraits de nopals ont affiché une bonne activité antioxydante comme conséquence d'une aptitude remarquable de piégeage de radicaux libres incluant les peroxydes lipidiques, et d'une capacité réductrice très nette. Les alcaloïdes étaient les plus faibles antioxydants de ces extraits.

L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire a permis de déduire que les extraits de nopals ont une bonne action d'atténuation du processus inflammatoire *in vitro*. Les extraits de nopals n'affectent aucune des deux voies de la coagulation, malgré qu'ils perturbent légèrement la voie exogène.

Cependant, l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits a démontré que les bêtaïnes, les caroténoïdes et les alcaloïdes de nopals d'Algérie, sont inefficaces aux concentrations testés vis-à-vis les souches pathogènes ou bénéfiques utilisées. Les polyphénols

sont les seuls à action antimicrobienne, auxquels les souches *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* et la levure *Candida albicans* étaient les plus sensibles. La souche bénéfique *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* (Bb12) a été résistante aux polyphénols de nopals.

L'analyse de la cytotoxicité des quatre extraits sur les cellules cancéreuses du foie HepG2, a révélé que les métabolites de nopals n'ont aucune cytotoxicité significative avec une absence d'influence sur les lysosomes et la succinate deshydrogénase mitochondriale. Les caroténoïdes avaient marqué une dépendance métabolique aux enzymes CYP de cette lignée cellulaire, comme ils ont provoqué la surproduction des espèces réactives oxygénées et nitrosées. Les quatre classes phyto-chimiques ont exercé un effet dépolarisant sur la membrane mitochondriale.

L'ensemble de ces propriétés biologiques confèrent aux jeunes cladodes d'*O. ficus indica* d'Algérie le statut de source potentielle en composés bioactifs susceptibles de jouer le rôle d'intrants dans les industries pharmaceutique, cosmétique, voire alimentaire. Les résultats obtenus dans ce travail peuvent être à la base d'une vulgarisation plus large de l'importance multiple (écologique, agronomique, alimentaire, pharmaceutique, cosmétique) de *l'Opuntia* dont le développement dans les zones semi-arides, arides et désertiques qui caractérisent presque 80% de notre territoire semble revêtir un intérêt national.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

1. Abdulazeem, L., Al-Alaq, F. T., Alrubaei, H. A., Al-Mawlah, Y. H., & Alwan, W. K. (2018). Anti-cancer activity of *Opuntia polyacantha* alkaloid extract on human breast cancer cell line. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(7), 1753-1754.
2. Abidi, S., Salem, H. B., Vasta, V., & Priolo, A. (2009). Supplementation with barley or spineless cactus (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) cladodes on digestion, growth and intramuscular fatty acid composition in sheep and goats receiving oaten hay. *Small Ruminant Research*, 87(1-3), 9-16.
3. Abramov, A. Y., & Duchon, M. R. (2008). Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777(7-8), 953-964.
4. Adli, N., Abu, M. N., Mastuki, M. F., Yusoff, W. S. Y. W., & Kamarudin, E. (2016). In vitro haemostatic activity of *rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) hassk. Aqueous leaf extract. *Jurnal Teknologi*, 78(5-6).
5. Afsar, T., Razak, S., Khan, M. R., Mawash, S., Almajwal, A., Shabir, M., & Haq, I. U. (2016). Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydasypica* R. Parker aerial parts. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 258.
6. Aitdafoun, M., Mounier, C., Heymans, F., Binisti, C., Bon, C., & Godfroid, J. J. (1996). 4-Alkoxybenzamides as new potent phospholipase A2 inhibitors. *Biochemical pharmacology*, 51(6), 737-742.
7. Alam, M. N., Biozid, M. S., Islam, M. R., Rahman, M. M., Chowdhury, A. I., & Mazumdar, M. M. U. (2015). In-vitro comparative study of Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of the methanol extract of *Cissus pentagona* Roxb and *Thunbergia grandiflora* Roxb. Leaf. *The Pharma Innovation*, 4(4, Part A), 39.
8. Alcaraz, L. E., Blanco, S. E., Puig, O. N., Tomas, F., & Ferretti, F. H. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of theoretical Biology*, 205(2), 231-240.
9. Allegra, M., D'Anneo, A., Frazzitta, A., Restivo, I., Livrea, M. A., Attanzio, A., & Tesoriere, L. (2020). The Phytochemical Indicaxanthin Synergistically Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis in HeLa Cells via Oxidative Stress-Dependent p53/p21/waf1 Axis. *Biomolecules*, 10(7), 994.
10. Al-Sehemi, A. G., & Irfan, A. (2017). Effect of donor and acceptor groups on radical scavenging activity of phenol by density functional theory. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1703-S1710.
11. Alves, F. A. L., Andrade, A. P. D., Bruno, R. D. L. A., Silva, M. G. D. V., Souza, M. D. F. V. D., & Santos, D. C. D. (2017). Seasonal variability of phenolic compounds and antioxidant activity in prickly pear cladodes of *Opuntia* and *Nopalea* genres. *Food Science and Technology*, 37(4), 536-543.
12. Alves, F. A. L., de Andrade, A. P., Bruno, R. D. L. A., de Vasconcelos Silva, M. G., de Souza, M. D. F. V., Pessoa, C., ... & dos Santos, D. C. (2016). Genetic diversity and seasonal chemical profile by ¹H NMR and cytotoxic activity in *Opuntia* and *Nopalea* genres. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(40), 732-747.

13. Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*, 84(4), 551-562.
14. Amellal nee Chibane, H. (2008). *Aptitudes technologique de quelques variétés communes de dattes: formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé* (Doctoral dissertation, Université de Boumerdès-M'hamed Bougara).
15. Ammar, I., Ennouri, M., & Attia, H. (2015). Phenolic content and antioxidant activity of cactus (*Opuntia ficus-indica* L.) flowers are modified according to the extraction method. *Industrial crops and products*, 64, 97-104.
16. Ammar, R. B., Bhouiri, W., Sghaier, M. B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., ... & Dijoux-Franca, M. G. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, 116(1), 258-264.
17. Amorim-Carrilho K.T., Cepeda A., Fente C., Regal P. Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in analytical chemistry*. (2014). 56. 49-73
18. Anderson, E. F. (2001). *The cactus family*. Timber Press (OR).
19. Angulo-Bejarano, P. I., Martínez-Cruz, O., & Paredes-López, O. (2014). Phytochemical content, nutraceutical potential and biotechnological applications of an ancient Mexican plant: nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Current Nutrition & Food Science*, 10(3), 196-217.
20. Antia, U., Lee, H. S., Kydd, R. R., Tingle, M. D., & Russell, B. R. (2009). Pharmacokinetics of 'party pill' drug N-benzylpiperazine (BZP) in healthy human participants. *Forensic science international*, 186(1-3), 63–67.
21. Arba, M. (2009, May). Le cactus *Opuntia*, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc. In *Actes du Symposium International AGDUMED-durabilité des systèmes de culture en zone méditerranéenne et gestion des ressources en eau et en sol* (pp. 14-16). Rabat: Cana Print.
22. Arba, M., Aich, E. L., Sarti, A., Belbahri, B., Boubkraoui, L. L., Ait Hammou, A., ... & Sbaa, A. H. (2000). Valorisation du figuier de barbarie en élevage. *Bull Mens Inf Liaison PNTTA*, 68, 1-4.
23. Arbo, M. D., Silva, R., Barbosa, D. J., Dias da Silva, D., Silva, S. P., Teixeira, J. P., Bastos, M. L., & Carmo, H. (2016). In vitro neurotoxicity evaluation of piperazine designer drugs in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of applied toxicology : JAT*, 36(1), 121–130.
24. Arbo, M. D., Silva, R., Barbosa, D. J., da Silva, D. D., Rossato, L. G., de Lourdes Bastos, M., & Carmo, H. (2014). Piperazine designer drugs induce toxicity in cardiomyoblast h9c2 cells through mitochondrial impairment. *Toxicology letters*, 229(1), 178-189.
25. Aruwa, C. E., Amoo, S. O., & Kudanga, T. (2019). Extractable and macromolecular antioxidants of *Opuntia ficus-indica* cladodes: Phytochemical profiling, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany*, 125, 402-410.
26. Aruwa, C. E., Amoo, S. O., & Kudanga, T. (2018). *Opuntia* (Cactaceae) plant compounds, biological activities and prospects—A comprehensive review. *Food Research International*, 112, 328-344.
27. Association of Official Analytical Chemist "AOAC" (2002). Official Method of Analysis. 17th Edition, Association of Official Analytical, Washington DC.

28. Association of Official Analytical Chemist "AOAC" (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th edition. AOAC International. Washington, D.C.
29. Association of Official Analytical Chemist "AOAC" (1995). Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th edition. AOAC International. USA.
30. Astello-García, M. G., Cervantes, I., Nair, V., del Socorro Santos-Díaz, M., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F., ... & de la Rosa, A. P. B. (2015). Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 119-130.
31. Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Khebri, S. (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese science journal*, 11(1), 69-81.
32. Athukorala, Y., Lee, K. W., Kim, S. K., & Jeon, Y. J. (2007). Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource technology*, 98(9), 1711-1716.
33. Ayadi, M. A., Abdelmaksoud, W., Ennouri, M., & Attia, H. (2009). Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 40-47.
34. Ayinke, A. B., Morakinyo, M. A., Olalekan, I. M., Philip, T. O., Mariam, O. O., & Oluokun, O. O. (2015). In vitro evaluation of membrane stabilizing potential of selected bryophyte species. *European Journal of Medicinal Plants*, 181-190.
35. Ayodele, O. O., Onajobi, F. D., & Osoniyi, O. (2019). In vitro anticoagulant effect of *Crassocephalum crepidioides* leaf methanol extract and fractions on human blood. *Journal of experimental pharmacology*, 11, 99.
36. Azeredo, H. M. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *International journal of food science & technology*, 44(12), 2365-2376.

B

37. Bacanlı, M., Anlar, H. G., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2017). Assessment of Cytotoxicity Profiles of Different Phytochemicals: Comparison of Neutral Red and MTT Assays in Different Cells in Different Time Periods. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 14(2), 95–107.
38. Bailey, I. W. (1961). Comparative anatomy of the leaf-bearing Cactaceae, III: form and distribution of crystals in *Pereskia*, *Pereskiaopsis* and *Quiabentia*. *Journal of the Arnold Arboretum*, 42(3), 334-346.
39. Bailey-Shaw, Y. A., Williams, L. A., Green, C. E., Rodney, S., & Smith, A. M. (2017). In-Vitro Evaluation of the Anti-Inflammatory Potential of Selected Jamaican Plant Extracts using the Bovine Serum Albumin Protein Denaturation Assay. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 47(1), 145-53.
40. Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S., & Werck-Reichhart, D. (2011). Cytochromes p450. *The arabidopsis book*, 9, e0144.
41. Bakari, S., Daoud, A., Felhi, S., Smaoui, S., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2017). Proximate analysis, mineral composition, phytochemical contents, antioxidant and antimicrobial activities and GC-MS investigation of various solvent extracts of cactus cladode. *Food Science and Technology*, 37(2), 286-293.
42. Barbera, G., Inglese, P., & Pimienta-Barrios, E. (Eds.). (1995). *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear* (Vol. 132). Italy: FAO.

43. Barbera, G. (1991). Utilizzazione economica delle opunzie in Messico. *Frutticoltura*, 53(2), 41-48.
44. Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sanchez, E., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2017). Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological research*, 196, 44-68.
45. Bari, M. N., Zubair, M., Rizwan, K., Rasool, N., Bukhari, I. H., Akram, S., ... & Ahmad, V. U. (2012). Biological activities of *Opuntia Monacantha* cladodes. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 34(4).
46. Basheer, L., & Kerem, Z. (2015). Interactions between CYP3A4 and dietary polyphenols. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
47. Bedada, W., de Andrés, F., Engidawork, E., Hussein, J., LLerena, A., & Aklillu, E. (2018). Effects of Khat (*Catha edulis*) use on catalytic activities of major drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes and implication of pharmacogenetic variations. *Scientific reports*, 8(1), 12726.
48. Belhadj Slimen, I., Najar, T., & Abderrabba, M. (2017). Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(4), 675-689.
49. Ben Saad, A., Dalel, B., Rjeibi, I., Smida, A., Ncib, S., Zouari, N., & Zourgui, L. (2017). Phytochemical, antioxidant and protective effect of cactus cladodes extract against lithium-induced liver injury in rats. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 516-525.
50. Benattia, F. K. *Analyse et Application des Extraits de pépains de Fignes de Barbarie* (Doctoral dissertation, 08-01-2018).
51. Benattia, F. K., & Arrar, Z. (2018). Antioxidative and Antiradical Activities of Bioactive Compounds of Extracts From Algerian Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*. L) Fruits. *Current Nutrition & Food Science*, 14(3), 211-217.
52. Bensadón, S., Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S. G., & Goñi, I. (2010). By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant foods for human nutrition*, 65(3), 210-216.
53. Berkov, S., Pavlov, A., Ilieva, M., Burrus, M., Popov, S., & Stanilova, M. (2005). CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their in vitro cultures. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 16(2), 98-103.
54. Bernard, F. X., Sable, S., Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J. F., Crouzet, J., & Blanche, F. (1997). Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(5), 992-998.
55. Betancourt, C., Cejudo-Bastante, M. J., Heredia, F. J., & Hurtado, N. (2017). Pigment composition and antioxidant capacity of betacyanins and betaxanthins fractions of *Opuntia dillenii* (Ker Gawl) Haw cactus fruit. *Food Research International*, 101, 173-179.
56. Bezzala, A. (2005). Essai d'introduction de l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) dans la zone de M'doukel et évaluation de quelques paramètres de résistance à la sécheresse. Mémoire. Magistère en Sciences Agronomiques. Option: Forêt et conservation des sols. Université El Hadj Lakhdar Faculté des Sciences-Batna. Algérie. 143p.
57. BHIRA, O. (2012). *Potentialités thérapeutiques d'Opuntia ficus indica au Maroc et en Tunisie* (Doctoral dissertation).

58. Bijak, M., Ponczek, M. B., & Nowak, P. (2014). Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X. *International journal of biological macromolecules*, 65, 129-135.
59. Bitensky, L. (2008). The Reversible Activation of Lysosomes in Normal Cells and the Effects of Pathological Conditions.
60. Blando, F., Russo, R., Negro, C., De Bellis, L., & Frassinetti, S. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cladode polyphenolic extracts. *Antioxidants*, 8(5), 117.
61. Blann, A. D., & Khoo, C. W. (2009). The prevention and treatment of venous thromboembolism with LMWHs and new anticoagulants. *Vascular health and risk management*, 5, 693.
62. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
63. Boke, N. H. (1944). Histogenesis of the leaf and areole in *Opuntia cylindrica*. *American Journal of Botany*, 31(6), 299-316.
64. Bouayed, J., & Bohn, T. (2012). Dietary derived antioxidants: implications on health. *Nutrition, Well-Being and Health. Croatia: InTech*, 1-22.
65. Boutakiout, A. (2015). Etude physico-chimique, biochimique et stabilité d'un nouveau produit: jus de cladode du figuier de Barbarie marocain (*Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha*) (Doctoral dissertation, Université d'Angers).
66. Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558.
67. Brückner, H., & Westhauser, T. (2003). Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino acids*, 24(1-2), 43-55.
68. Bruneton, J. (1999). Huiles essentielles. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Éditions Tec & Doc, 3e édition, Lavoisier, Paris, France.
69. Buckingham, J., Baggaley, K. H., Roberts, A. D., & Szabo, L. F. (Eds.). (2010). *Dictionary of Alkaloids with CD-ROM*. CRC press.
70. Bud C. Tennant, Sharon A. Center (2008): Chapter 13 - Hepatic Function, Editor(s): J. Jerry Kaneko, John W. Harvey, Michael L. Bruss, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (Sixth Edition), Academic Press, Pages 379-412, ISBN 9780123704917,
71. Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., ... & Livrea, M. A. (2002). Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6895-6901.
72. Buxbaum, F. (1950). *Morphology of cacti: Section i. roots and stems*. Abbey Garden Press.

C

73. Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R., & Corke, H. (1998). Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2063-2070.
74. Cano, M. P., Gómez-Maqueo, A., García-Cayuela, T., & Welti-Chanes, J. (2017). Characterization of carotenoid profile of Spanish Sanguinos and Verdal prickly pear (*Opuntia ficus-indica*, spp.) tissues. *Food chemistry*, 237, 612-622.

75. Cantwell, M., Rodriguez-Felix, A., & Robles-Contreras, F. (1992). Postharvest physiology of prickly pear cactus stems. *Scientia Horticulturae*, 50(1-2), 1-9.
76. Casas, A., & Barbera, G. (2002). Mesoamerican domestication and diffusion. *Cacti: biology and uses*, 143, 62.
77. Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758-5764.
78. Castellar, R., Obón, J. M., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2772-2776.
79. Chaalal, M., Touati, N., & Louaileche, H. (2012). Extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity of prickly pear seeds. *Acta botanica gallica*, 159(4), 467-475.
80. Chandel, N. S., & Tuveson, D. A. (2014). The promise and perils of antioxidants for cancer patients. *New England Journal of Medicine*, 371(2), 177-178.
81. Chao, P. C., Hsu, C. C., & Yin, M. C. (2009). Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutrition & metabolism*, 6(1), 33.
82. Chaouch, M. A., Hammi, K. M., Dhahri, M., Mansour, M. B., Maaroufi, M. R., Le Cerf, D., & Majdoub, H. (2018). Access to new anticoagulant by sulfation of pectin-like polysaccharides isolated from *Opuntia ficus indica* cladodes. *International journal of biological macromolecules*, 120, 1794-1800.
83. Chaouche, F. Z., & Abdul-Hussain, M. S. (2008). Contribution à l'étude de l'*Opuntia* et perspectives d'amélioration, dans le milieu steppique. *Agricultura*, 65(1-2).
84. Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International journal of biological macromolecules*, 41(1), 42-48.
85. Chavez-Santoscoy, R. A., Gutierrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2009). Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2), 146-152.
86. Chen, J., Shi, J., MacNaughton, L., Kakuda, Y., Xue, S. J., Ma, Y., ... & Jiang, Y. (2009). The scavenging capacity of combinations of lycopene, β -carotene, vitamin e, and vitamin c on the free radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Journal of food biochemistry*, 33(2), 232-245.
87. Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7429-7436.
88. Chentli, A. (2015). Valorisation nutritionnelle d'*Opuntia* et *Acacia* spp. dans l'alimentation des ruminants. Thèse de doctorat, Université Mentouri, Constantine, Algérie.
89. Chernomorsky, S., Segelman, A., & Poretz, R. D. (1999). Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 19(5), 313-322.

90. Chew, B. P., Wong, T. S., Michal, J. J., Standaert, F. E., & Heirman, L. R. (1991). Subcellular distribution of β -carotene, retinol, and α -tocopherol in porcine lymphocytes after a single injection of β -carotene. *Journal of animal science*, 69(12), 4892-4897.
91. Chintu, R. K., Patel, U. D., Chauhan, V. B., Patel, H. B., Chirag, M., Modi, P. R. B., ... & Shah, T. M. (2017). In-vitro antioxidant and antidiabetic activity of hydro alcoholic extract of opuntia elatior fruit as well as quercetin.
92. Chiteva, R., & Wairagu, N. (2013). Chemical and nutritional content of *Opuntia ficus-indica* (L.). *African Journal of Biotechnology*, 12(21).
93. Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., & Chou, S. T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2454-2458.
94. Ciocan, I.D., Bara, I.I., (2007). Plant products as antimicrobial agents. *Analele Stiintifice ale Universitatii, Alexandru Ioan Cuza, Sectiunea Genetiasi Biologie Moleculara* 8, 151–156
95. Collingborn, F. M., Gowen, S. R., & Mueller-Harvey, I. (2000). Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three musa cultivars in response to *radopholus similis* infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5297-5301.
96. Contreras-Padilla, M., Gutiérrez-Cortez, E., del Carmen Valderrama-Bravo, M., Rojas-Molina, I., Espinosa-Arbeláez, D. G., Suárez-Vargas, R., & Rodríguez-García, M. E. (2012). Effects of drying process on the physicochemical properties of nopal cladodes at different maturity stages. *Plant foods for human nutrition*, 67(1), 44-49.
97. Cordell, G. A., Quinn-Beattie, M. L., & Farnsworth, N. R. (2001). The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 15(3), 183-205.
98. Corrêa, T. A. F., Rogero, M. M., Hassimotto, N. M. A., & Lajolo, F. M. (2019). The Two-Way Polyphenols-Microbiota Interactions and Their Effects on Obesity and Related Metabolic Diseases. *Frontiers in Nutrition*, 6.
99. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
100. Cr, Metcalf., & Chalk, L. (1979). *Anatomy of the dicotyledons*, vol I.
101. Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.

D

102. Daoud, A., Malika, D., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafigui, K., Kadri, A., & Gharsallah, N. (2019). Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3075-3086.
103. Das, K., Tiwari, R. K. S., & Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*, 4(2), 104-111.

104. De Abreu, I. N., & Mazzafera, P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3), 241-248.
105. De Almeida, C. G., Garbois, G. D., Amaral, L. M., Diniz, C. C., & Le Hyaric, M. (2010). Relationship between structure and antibacterial activity of lipophilic N-acyldiamines. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 64(4), 287-290.
106. De Man, J. C., Rogosa, D., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.
107. De Santiago, E., Gill, C. I., Carafa, I., Tuohy, K. M., De Peña, M. P., & Cid, C. (2019). Digestion and colonic fermentation of raw and cooked *Opuntia ficus-indica* cladodes impacts bioaccessibility and bioactivity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(9), 2490-2499.
108. De Santiago, E., Domínguez-Fernández, M., Cid, C., & De Peña, M. P. (2018). Impact of cooking process on nutritional composition and antioxidants of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food chemistry*, 240, 1055-1062.
109. De Souza, V. R., de Andrade Moura, L., da Silva, A. C. R., Pereira, K. K. G., Nogueira, C. C. R., Cavalcanti, D. N., ... & Fuly, A. E. L. (2019). Exploring the anticoagulant and antiplatelet effect of the extracts of the red marine alga *Acanthophora spicifera*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 13(2), 31-40.
110. De Wit, M., du Toit, A., Osthoff, G., & Hugo, A. (2019). Cactus pear antioxidants: A comparison between fruit pulp, fruit peel, fruit seeds and cladodes of eight different cactus pear cultivars (*Opuntia ficus-indica* and *Opuntia robusta*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 2347-2356.
111. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), 1818-1892.
112. Deng, Z. Y., Shan, W. G., Wang, S. F., Hu, M. M., & Chen, Y. (2017). Effects of astaxanthin on blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation in hyperlipidemic rats. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 663-672.
113. Dias da Silva, D., Ferreira, B., Roque Bravo, R., Rebelo, R., Duarte de Almeida, T., Valente, M. J., Silva, J. P., Carvalho, F., Bastos, M. L., & Carmo, H. (2019). The new psychoactive substance 3-methylmethcathinone (3-MMC or metaphedrone) induces oxidative stress, apoptosis, and autophagy in primary rat hepatocytes at human-relevant concentrations. *Archives of toxicology*, 93(9), 2617-2634.
114. Dias da Silva, D., Silva, M. J., Moreira, P., Martins, M. J., Valente, M. J., Carvalho, F., Bastos, M. L., & Carmo, H. (2017). In vitro hepatotoxicity of 'Legal X': the combination of 1-benzylpiperazine (BZP) and 1-(m-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) triggers oxidative stress, mitochondrial impairment and apoptosis. *Archives of toxicology*, 91(3), 1413-1430.
115. Dias-da-Silva, D., Arbo, M. D., Valente, M. J., Bastos, M. L., & Carmo, H. (2015). Hepatotoxicity of piperazine designer drugs: Comparison of different in vitro models. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 29(5), 987-996.

116. Dias da Silva, D., Carmo, H., Lynch, A., & Silva, E. (2013a). An insight into the hepatocellular death induced by amphetamines, individually and in combination: the involvement of necrosis and apoptosis. *Archives of toxicology*, 87(12), 2165–2185.
117. Dias da Silva, D., Silva, E., & Carmo, H. (2013b). Cytotoxic effects of amphetamine mixtures in primary hepatocytes are severely aggravated under hyperthermic conditions. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 27(6), 1670–1678.
118. Dias, M. G., Camões, M. F. G., & Oliveira, L. (2009). Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 113(3), 808-815.
119. Díaz, M. D. S. S., de la Rosa, A. P. B., Héliès-Toussaint, C., Guéraud, F., & Nègre-Salvayre, A. (2017). *Opuntia* spp.: characterization and benefits in chronic diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
120. Dib, H., Belarbi, M., Beghdad, M. C., & Seladji, M. (2014). Antioxidant activity of *Opuntia ficus-indica* flowers phenolic extracts. *Int J Pharm Sci Res*, 5, 4574-82.
121. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J. F., & Stocker, P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 224(6), 801-809.
122. Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1250, 77–93.
123. Donato, M. T., Lahoz, A., Castell, J. V., & Gómez-Lechón, M. J. (2008). Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Current drug metabolism*, 9(1), 1–11.
124. Dos Santos, R., Pimenta-Freire, G., & Dias-Souza, M. V. (2015). Carotenoids and flavonoids can impair the effectiveness of some antimicrobial drugs against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *International Food Research Journal*, 22(5).
125. Drăgan, M. A. R. I. A., Stan, C. D., Panzariu, A., & Profire, L. E. N. U. Ț. A. (2016). Evaluation of anti-inflammatory potential of some new ferullic acid derivatives. *Farmacia*, 64(2), 194-197.
126. Du, G. X. (2011). *Study on the Isolation, Purification and Antioxidant Activities of Alkaloids in Maca*, South China University of Technology, Guangzhou, China, 2011.
127. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
128. Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., & Sroka, P. (2015). Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European journal of nutrition*, 54(3), 325-341.
129. Dueñas, M., González-Manzano, S., González-Paramás, A., & Santos-Buelga, C. (2010). Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 443-449.
130. Duh, P. D. (1998). Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(4), 455-461.

131. Dzedzic, A., Wojtyczka, R. D., & Kubina, R. (2015). Inhibition of oral streptococci growth induced by the complementary action of berberine chloride and antibacterial compounds. *Molecules*, 20(8), 13705-13724.

E

132. El Hachimi, F., Alfaiz, C., Bendriss, A., Cherrah, Y., & Alaoui, K. (2017). Activité anti-inflammatoire de l'huile des graines de *Zizyphus lotus* (L.) Desf. *Phytothérapie*, 15(3), 147-154.
133. El Kharrassi, Y. (2015). *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 microgliales BV2* (Doctoral dissertation).
134. El-Agamey, A., & McGarvey, D. J. (2008). Carotenoid radicals and radical ions. In *Carotenoids* (pp. 119-154). Birkhäuser Basel.
135. El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M., ... & Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879-14901.
136. Erianti, F., Nadhila, A. R., & Adiba, S. E. (2015). Screening of tropical fruits for antiinflammation activity in vitro in South Kalimantan Indonesia. *J Med Biol Eng*, 4, 407-411.
137. Espiard, E. (2002). *Introduction à la transformation industrielle des fruits*. Éd. Tec & Doc.
138. Evensen, N. A., & Braun, P. C. (2009). The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Canadian journal of microbiology*, 55(9), 1033-1039.

F

139. Farabegoli, F., Scarpa, E. S., Frati, A., Serafini, G., Papi, A., Spisni, E., ... & Ninfali, P. (2017). Betalains increase vitexin-2-O-xyloside cytotoxicity in CaCo-2 cancer cells. *Food chemistry*, 218, 356-364.
140. Farkash, Y., Feldman, M., Ginsburg, I., Steinberg, D., & Shalish, M. (2018). Green Tea Polyphenols and Padma Hepaten Inhibit *Candida albicans* Biofilm Formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
141. Fellows, M. D., & O'Donovan, M. R. (2007). Cytotoxicity in cultured mammalian cells is a function of the method used to estimate it. *Mutagenesis*, 22(4), 275-280.
142. Fernandez, M. L., Trejo, A., & McNamara, D. J. (1990). Pectin isolated from prickly pear (*Opuntia* sp.) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol-fed guinea pigs. *The Journal of nutrition*, 120(11), 1283-1290.
143. Fernández-López, J. A., Castellar, R., Obón, J. M., & Almela, L. (2002). Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. *Chromatographia*, 56(9-10), 591-595.
144. Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., & Araujo, M. E. M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108(1), 31-37.

145. Ferrer, I., Thurman, E. M., & Fernández-Alba, A. R. (2005). Quantitation and accurate mass analysis of pesticides in vegetables by LC/TOF-MS. *Analytical Chemistry*, 77(9), 2818-2825.
146. Feugang, J. M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F. C., & Zou, C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci*, 11(1), 2574-2589.
147. Filman, D. J., Brawn, R. J., & Dandliker, W. B. (1975). Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage. *Journal of Immunological Methods*, 6(3), 189-207.
148. Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell death and differentiation*, 22(3), 377-388.
149. Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2), 171-177.
150. Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
151. Freeman, T. P. (1969). The developmental anatomy of *Opuntia basilaris*. I. Embryo, root, and transition zone. *American Journal of Botany*, 56(9), 1067-1074.
152. Frutos, P., Hervás, G., Ramos, G., Giráldez, F. J., & Mantecon, A. R. (2002). Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology*, 95(3-4), 215-226.

G

153. Gadamsetty, G., Maru, S., & Sarada, N. C. (2013). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of the Methanolic Leaf Extract of Traditionally Used Medicinal Plant *Mimusops elengi* L. *Journal of pharmaceutical sciences and research*, 5(6), 125.
154. Galati, G., & O'brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287-303.
155. Galati, E. M., Tripodo, M. M., Trovato, A., d'Aquino, A., & Monforte, M. T. (2003). Biological activity of *Opuntia ficus indica* cladodes II: Effect on experimental hypercholesterolemia in rats. *Pharmaceutical biology*, 41(3), 175-179.
156. Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzman, N. E., González-Laredo, R. F., Reynoso-Camacho, R., Medina-Torres, L., & Cervantes-Cardozo, V. (2009). Effect of air flow rate on the polyphenols content and antioxidant capacity of convective dried cactus pear cladodes (*Opuntia ficus indica*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup2), 80-87.
157. Gan, J., Feng, Y., He, Z., Li, X., & Zhang, H. (2017). Correlations between antioxidant activity and alkaloids and phenols of maca (*Lepidium meyenii*). *Journal of Food Quality*, 2017.
158. Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2016). Biological activities of plant pigments betalains. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(6), 937-945.

159. Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in plant science*, 18(6), 334-343.
160. Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2012). Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *Journal of natural products*, 75(6), 1030-1036.
161. Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2010). Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*, 232(2), 449-460.
162. Gandia-Herrero, F., Escribano, J., & Garcia-Carmona, F. (2009). The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. *Journal of natural products*, 72(6), 1142-1146.
163. Gaouar, N. (2011). Etude de la valeur nutritive de la caroube de différentes variétés Algériennes (thèse de doctorat). Université Belkaid, Tlemcen, Algérie.
164. García, F. H., Coll, L. A., Cano-Lamadrid, M., Lluch, D. L., Barrachina, Á. A. C., & Murcia, P. L. (2020). Valorization of Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill]: Nutritional Composition, Functional Properties and Economic Aspects. In *Cactaceae- Current Trends and Future Perspectives*. IntechOpen.
165. García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9), 537-552.
166. Gerets, H. H., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B. O., Dhalluin, S., & Atienzar, F. A. (2012). Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell biology and toxicology*, 28(2), 69-87.
167. Ghumre, S. V., Sawant, M. G., Jadhav, V. M., Kadam, V. J., Sonawane, N., & Ramaiya, M. (2017). Assessment of in-vitro anti-inflammatory activity of *Cynodon dactylon* and acyclovir showing synergistic effect by albumin denaturation and membrane stabilization assay. *Modern Approaches in Drug Designing*, 1(2), 1-5.
168. Gibson, A. C., & Nobel, P. S. (1986). *The cactus primer*. Harvard University Press.
169. Gibson, A. C. (1976). Vascular organization in shoots of Cactaceae. I. Development and morphology of primary vasculature in Pereskioideae and Opuntioideae. *American Journal of Botany*, 63(4), 414-426.
170. Ginestra, G., Parker, M. L., Bennett, R. N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., ... & Waldron, K. W. (2009). Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10323-10330.
171. Gliszczyńska-Świgło, A., Szymusiak, H., & Malinowska, P. (2006). Betanin, the main pigment of red beet: Molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. *Food additives and contaminants*, 23(11), 1079-1087.
172. Gnanakalai, K. A. N. N. U. S. A. M. Y., & Gopal, R. E. N. G. A. S. W. A. M. Y. (2016). In vitro antibacterial activities of *Opuntia ficus-indica* stem and fruit extracts using disc diffusion method. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 8, 68-69.
173. Gomez-flores, R., Tamez-guerra, P., Taméz-Guerra, R., Rodríguez-Padilla, C., Monreal-Cuevas, E., Hauad-Marroquin, L..., Cordova-Puente, C., & Rangel-Llanas, A. (2006). In

- vitro Antibacterial and Antifungal Activities of Nopalea cochenillifera Pad Extracts. *American Journal of Infectious Diseases*, 2, 1-8.
174. González-Montero, J. (2009). Determinación del contenido total de compuestos fenólicos en nopal (*Opuntia ficus-indica*) var. Milpa Alta, fresco y procesado. Undergraduate thesis, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
175. Gordon, G. J., Coleman, W. B., & Grisham, J. W. (2000). Induction of cytochrome P450 enzymes in the livers of rats treated with the pyrrolizidine alkaloid retrorsine. *Experimental and molecular pathology*, 69(1), 17-26.
176. Gordon, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. In *Food antioxidants* (pp. 1-18). Springer, Dordrecht.
177. Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox biology*, 6, 260-271.
178. Guengerich, F. P., & Munro, A. W. (2013). Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17065-17073.
179. Guevara, J. C., Yahia, E. M., & De La Fuente, E. B. (2001). Modified atmosphere packaging of prickly pear cactus stems (*Opuntia* spp.). *LWT-Food Science and Technology*, 34(7), 445-451.
180. Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L. W., ... & de la Rosa, A. P. B. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 525-532.
181. Guinoiseau, E., Lorenzi, V., Luciani, A., Tomi, F., Casanova, J., & Berti, L. (2011). Susceptibility of the multi-drug resistant strain of *Enterobacter aerogenes* EA289 to the terpene alcohols from *Cistus ladaniferus* essential oil. *Natural product communications*, 6(8), 1934578X1100600830.
182. Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Chea, A., & Topal, F. (2010). Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 25(1), 44-53.
183. Gungor, N., & Sengul, M. (2008). Antioxidant activity, total phenolic content and selected physicochemical properties of white mulberry (*Morus alba* L.) fruits. *International Journal of Food Properties*, 11(1), 44-52.
184. Guo, J., Zhang, D., Yu, C., Yao, L., Chen, Z., Tao, Y., & Cao, W. (2019). Phytochemical Analysis, Antioxidant and Analgesic Activities of *Incarvillea compacta* Maxim from the Tibetan Plateau. *Molecules*, 24(9), 1692.
185. Guo, L., Dial, S., Shi, L., Branham, W., Liu, J., Fang, J. L., Green, B., Deng, H., Kaput, J., & Ning, B. (2011). Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 39(3), 528-538.
186. Gupta, A., Birhman, K., Raheja, I., Sharma, S. K., & Kar, H. K. (2016). Quercetin: A wonder bioflavonoid with therapeutic potential in disease management. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(3), 248-252.
187. Guzzo, G., Sciacovelli, M., Bernardi, P., & Rasola, A. (2014). Inhibition of succinate dehydrogenase by the mitochondrial chaperone TRAP1 has anti-oxidant and anti-apoptotic effects on tumor cells. *Oncotarget*, 5(23), 11897-11908.

188. Gwiazdowska, D., Juś, K., Jasnowska-Małecka, J., & Kluczyńska, K. (2015). The impact of polyphenols on Bifidobacterium growth. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4).

H

189. Habibi, Y. (2004). *Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de barbarie. Les polysaccharides pariétaux: caractérisation et modification chimique* (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
190. Habli, Z., Toumeh, G., Fatfat, M., Rahal, O. N., & Gali-Muhtasib, H. (2017). Emerging cytotoxic alkaloids in the battle against cancer: overview of molecular mechanisms. *Molecules*, 22(2), 250.
191. Haddouchi, F., Lazouni, H. A., Meziane, A., & Benmansour, A. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 5(2).
192. Halestrap, A. P. (2006). Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die.
193. Hall JE, Guyton AC (2011) Textbook of Medical Physiology, Elsevier Health Sciences, Amsterdam, Netherlands, 12th edition.
194. Han, R. M., Zhang, J. P., & Skibsted, L. H. (2012). Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. *Molecules*, 17(2), 2140-2160.
195. Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., & Kinoshita, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48(1), 125-129.
196. Hasan, U. H., Uttra, A. M., & Rasool, S. (2015). Evaluation of in vitro and in vivo anti-arthritic potential of *Berberis calliobotrys*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(4), 807-819.
197. Hassanpour, S., MaheriSis, N., & Eshratkhah, B. (2011). Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review.
198. Herrera, C. L., Alvear, M., Barrientos, L., Montenegro, G., & Salazar, L. A. (2010). The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp. *Ciencia e investigación agraria*, 37(1), 75-84.
199. Hirasawa, M., & Takada, K. (2004). Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 225-229.
200. Hoffmann, W. B., Inglese, P., Pimienta Barrios, E., & Arias JimÚnez, E. D. J. (1995). *Ethnobotany. Agro-ecology cultivation and uses of cactus pear*. FAO, Roma (Italia)..
201. Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
202. HÜSNÜ, C. (2003). Industrial plants as source of dietary supplements. *Dietary Supplements of Plant Origin. A Nutrition and Health Approach*, 31-42.

I

203. Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1147(1), 132-136.

204. Inglese, P. (2018). Ecologie, Culture Et utilisations du Figuier De Barbarie. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. ISBN: 9789251303443-9251303444-250 pages.
205. Iranbakhsh, A., Oshaghi, M. A., & Majd, A. (2006). Distribution of atropine and scopolamine in different organs and stages of development in *Datura stramonium* L.(Solanaceae). Structure and ultrastructure of biosynthesizing cells. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48(1), 13-18.
206. Izuegbuna, O., Otunola, G., & Bradley, G. (2019). Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *Opuntia stricta* cladodes. *Plos one*, 14(1), e0209682.

J

207. Jaganath, I. B., Mullen, W., Lean, M. E., Edwards, C. A., & Crozier, A. (2009). In vitro catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(8), 1180-1189.
208. James, M. L., Ross, A. C., Nicola, T., Steele, C., & Ambalavanan, N. (2013). VARA attenuates hyperoxia-induced impaired alveolar development and lung function in newborn mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 304(11), L803-L812.
209. Jaramillo-Flores, M. E., González-Cruz, L., Cornejo-Mazon, M., Dorantes-Alvarez, L., Gutierrez-Lopez, G. F., & Hernandez-Sanchez, H. (2003). Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food science and technology international*, 9(4), 271-278.
210. Jayakumar, K., VG, M. K., & Murugan, K. (2016). Evaluation of antioxidant and antihemolytic activities of purified caulophyllumine-A from *Solanum mauritianum* Scop. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(2), 195.
211. Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., & Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food chemistry*, 73(3), 285-290.
212. Jiang, R. W., Hon, P. M., Xu, Y. T., Chan, Y. M., Xu, H. X., Shaw, P. C., & But, P. P. H. (2006). Isolation and chemotaxonomic significance of tuberostemospironine-type alkaloids from *Stemona tuberosa*. *Phytochemistry*, 67(1), 52-57.
213. Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Sánchez-Moreno, C., & Saura-Calixto, F. (2000). Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(11), 1686-1690.
214. Jiménez-Sierra, C., & Reyes, J. (2000). Las cactáceas de Metztitlán. *Metztitlán: Lugar de la luna y las maravillas. DF: Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca y Universidad Autónoma Metropolitana*.
215. Joslyn, M. A. (1970). Tannins and related phenolics. *Methods in food analysis*, 701-725. *Journal of chromatography B*. (2004). 812. 85-99

K

216. Kader, A. A. (2002). Cactus (prickly) pear: recommendations for maintaining postharvest quality. *Postharvest Technology Research and Information Centre, California, USA*.

217. Kahkeshani, N., Farzaei, F., Fotouhi, M., Alavi, S. S., Bahramsoltani, R., Naseri, R., ... & Bishayee, A. (2019). Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 22(3), 225.
218. Kakrani, P. H., Kakrani, H. N., & Raval, M. A. N. A. N. (2018). Cytotoxic effect of *Corchorus depressus* against HEPG2 and HLE human liver cancer cells. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(12), 187.
219. Kalil, A. C., Van Schooneveld, T. C., Fey, P. D., & Rupp, M. E. (2014). Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 312(15), 1552-1564.
220. Kamal, A. H., Tefferi, A., & Pruthi, R. K. (2007, July). How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 82, No. 7, pp. 864-873). Elsevier.
221. Kamel, B. S., & Kakuda, Y. (2008). Fatty acids in fruits and fruit products. *Fatty Acid in Foods and Their Health Implication*, 263.
222. Kanner, J., Harel, S., & Granit, R. (2001). Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(11), 5178-5185.
223. Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food chemistry*, 100(2), 584-589.
224. Katanić, J., Yousfi, F., Caruso, M. C., Matic, S., Monti, D. M., Loukili, E. H., ... & Petruk, G. (2019). Characterization of bioactivity and phytochemical composition with toxicity studies of different *Opuntia dillenii* extracts from Morocco. *Food Bioscience*, 30, 100410.
225. Kechebar, M. S. A., Karoune, S., Falleh, H., Belhamra, M., Rahmoune, C., & Ksouri, R. (2017). Lc-ms phenolic composition changes and antioxidant capacities of the saharan tree *Argania spinosa* leaves under salinity. *Courrier Du Savoir*, 23, 29-38.
226. Keller, J., Camaré, C., Bernis, C., Astello-García, M., de la Rosa, A. P. B., Rossignol, M., ... & Guéraud, F. (2015). Antiatherogenic and antitumoral properties of *Opuntia* cladodes: inhibition of low density lipoprotein oxidation by vascular cells, and protection against the cytotoxicity of lipid oxidation product 4-hydroxynonenal in a colorectal cancer cellular model. *Journal of physiology and biochemistry*, 71(3), 577-587.
227. Kempf, M., Wittig, M., Reinhard, A., von der Ohe, K., Blacquièrre, T., Ræzke, K. P., ... & Beuerle, T. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(3), 332-347.
228. Khamtache-Abderrahim, S., Lequart-Pillon, M., Gontier, E., Gaillard, I., Pilard, S., Mathiron, D., ... & Maiza-Benabdesselam, F. (2016). Isoquinoline alkaloid fractions of *Fumaria officinalis*: Characterization and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Industrial Crops and Products*, 94, 1001-1008.
229. Khan, F. A., Maalik, A., & Murtaza, G. (2016). Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. *journal of food and drug analysis*, 24(4), 695-702.
230. Khoo, L. T., Abas, F., Abdullah, J. O., Mohd Tohit, E. R., & Hamid, M. (2014). Anticoagulant activity of polyphenolic-polysaccharides isolated from *melastoma malabathricum* L. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.

231. Khule, N. R., Mahale, N. B., Shelar, D. S., Rokade, M. M., & Chaudhari, S. R. (2012). Extraction of pectin from citrus fruit peel and use as natural binder in paracetamol tablet. *Der Pharmacia Lettre*, 4(2), 558-564.
232. Kim, S. J., Kim, H. S., & Seo, Y. R. (2019). Understanding of ROS-inducing strategy in anticancer therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
233. Kim, J., Jho, K. H., Choi, Y. H., & Nam, S. Y. (2013). Chemopreventive effect of cactus (*Opuntia humifusa*) extracts: radical scavenging activity, pro-apoptosis, and anti-inflammatory effect in human colon (SW480) and breast cancer (MCF7) cells. *Food & function*, 4(5), 681-688.
234. Kishore, G. K., Pande, S., & Podile, A. R. (2005). Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, 95(10), 1157-1165.
235. Kocyigit, A., Guler, E. M., & Dikilitas, M. (2018). Role of antioxidant phytochemicals in prevention, formation and treatment of cancer. *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*. London: InterchOpen, 21-45.
236. Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
237. Koné, K. P. F. O., Soro, Y., & Siaka, S. (2017). Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 44, 15-22.
238. Korobkova, E. A. (2015). Effect of natural polyphenols on CYP metabolism: implications for diseases. *Chemical research in toxicology*, 28(7), 1359-1390.
239. Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M., & Vladimir-Knežević, S. (2005). Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharmaceutica*, 55(4), 423-430.
240. Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 26(6), 459-516.
241. Ku, S. K., & Bae, J. S. (2014). Antiplatelet, anticoagulant, and profibrinolytic activities of withaferin A. *Vascular pharmacology*, 60(3), 120-126.
242. Kuete, V., & Efferth, T. (2015). African flora has the potential to fight multidrug resistance of cancer. *BioMed Research International*, 2015.
243. Kuntić, V., Filipović, I., & Vujić, Z. (2011). Effects of rutin and hesperidin and their Al (III) and Cu (II) complexes on in vitro plasma coagulation assays. *Molecules*, 16(2), 1378-1388.
244. Kurek, A. N. N. A., Grudniak, A. M., Kraczkiewicz-Dowjat, A., & Wolska, K. I. (2011). New antibacterial therapeutics and strategies. *Pol J Microbiol*, 60(1), 3-12.
245. Kushagra, N., Singh, M. K., Dhansay, D., Verma, V. K., & Tripathi, D. K. (2010). Anti-inflammatory activity and chemo profile of plants used in traditional medicine: a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(5), 122-130.

L

246. Labu, Z. K., Laboni, F. R., Tarafdar, M., Howlader, M. S. I., & Rashid, M. H. (2015). Membrane stabilization as a mechanism of anti-inflammatory and thrombolytic activities

- of ethanolic extract of arial parts of *Spondias pinanata* (family: Anacardiaceae). *Pharmacologyonline*, 2, 44-51.
247. Le Houérou, H. N. (1996). The role of cacti (*Opuntiaspp.*) in erosion control, land reclamation, rehabilitation and agricultural development in the Mediterranean Basin. *Journal of Arid Environments*, 33(2), 135-159.
248. Lee, W., Lee, J., Kulkarni, R., Kim, M. A., Hwang, J. S., Na, M., & Bae, J. S. (2016). Antithrombotic and antiplatelet activities of small-molecule alkaloids from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Scientific reports*, 6, 21956.
249. Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., & Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in microbiology*, 157(9), 876-884.
250. Lee, J. C., Kim, H. R., Kim, J., & Jang, Y. S. (2002). Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(22), 6490-6496.
251. Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., ... & Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366(1-2), 177-196.
252. Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
253. LEOPOLDO, G. C., SANTIAGO, F. K., ARTURO, B. P. L., NORMA, G. V., & AUREA, B. N. (2012). Carotenoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of low-calorie nopal (*Opuntia ficus-indica*) marmalade. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(3), 267-275.
254. Li, X., Wang, G., Chen, D., & Lu, Y. (2015). β -Carotene and astaxanthin with human and bovine serum albumins. *Food chemistry*, 179, 213-221.
255. Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382). Academic Press.
256. Lin, J., Schyschka, L., Mühl-Benninghaus, R., Neumann, J., Hao, L., Nussler, N., Dooley, S., Liu, L., Stöckle, U., Nussler, A. K., & Ehnert, S. (2012). Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism. *Archives of toxicology*, 86(1), 87-95.
257. Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 4132.
258. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., & Farr, A. L. (1951). Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol chem*, 193(1), 265-271.

M

259. Maataoui, B. S., Hmyene, A., & Hilali, S. (2006). Activites antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie [*Opuntia ficus indica*]. *Lebanese science journal*, 7(1), 3-8.
260. Mabrouki, L., Zougari, B., Bendhifi, M., & Borgi, M. A. (2015). Evaluation of antioxidant capacity, phenol and flavonoid contents of *Opuntia streptacantha* and *Opuntia ficus indica* fruits pulp. *Nature & Technology*, (13), 2.

261. Machmudah, S., & Goto, M. (2013). Methods for extraction and analysis of carotenoids. *Natural products*, 3367-3411.
262. Maiza-Benabdesselam, F., Khentache, S., Bougoffa, K., Chibane, M., Adach, S., Chapeleur, Y., ... & Laurain-Mattar, D. (2007). Antioxidant activities of alkaloid extracts of two Algerian species of *Fumaria*: *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. *Records of Natural Products*, 1(2-3), 28.
263. Malainine, M. E., Dufresne, A., Dupeyre, D., Mahrouz, M., Vuong, R., & Vignon, M. R. (2003). Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*. Cellulose extraction and characterisation. *Carbohydrate Polymers*, 51(1), 77-83.
264. Malainine, M. E., Dufresne, A., Dupeyre, D., Mahrouz, M., Vuong, R., & Vignon, M. R. (2001). Structure et morphologie des raquettes et des epines du figuier de barbarie. *Cellulose*, 17,5.
265. Mariutti, L. R., Rodrigues, E., & Mercadante, A. Z. (2013). Carotenoids from *Byrsonima crassifolia*: Identification, quantification and in vitro scavenging capacity against peroxy radicals. *Journal of food composition and analysis*, 31(1), 155-160.
266. Matias, A., Nunes, S. L., Poejo, J., Mecha, E., Serra, A. T., Madeira, P. J. A., ... & Duarte, C. M. M. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activity of a flavonoid-rich concentrate recovered from *Opuntia ficus-indica* juice. *Food & function*, 5(12), 3269-3280.
267. Mauseth, J. D. (2006). Structure–function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany*, 98(5), 901-926.
268. Mauseth, J. D. (2005). Anatomical features, other than wood, in subfamily Opuntioideae (Cactaceae). *Haseltonia*, 2005(11), 113-125.
269. Mauseth, J. D. (2004). Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. *Journal of Plant Research*, 117(1), 69-76.
270. Mauseth, J. D. (2000). Theoretical aspects of surface-to-volume ratios and water-storage capacities of succulent shoots. *American Journal of Botany*, 87(8), 1107-1115.
271. Mauseth, J. D. (1984). Effect of growth rate, morphogenic activity, and phylogeny on shoot apical ultrastructure in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American journal of botany*, 71(9), 1283-1292.
272. Mauseth, J. D. (1980). Release of whole cells of *Nopalea* (Cactaceae) into secretory canals. *Botanical Gazette*, 141(1), 15-18.
273. Mayer, C., Côme, M., Blanckaert, V., Chini Zittelli, G., Faraloni, C., Nazih, H., Ouguerram, K., Mimouni, V., & Chénais, B. (2020). Effect of Carotenoids from *Phaeodactylum tricornutum* on Palmitate-Treated HepG2 Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(12), 2845.
274. Medina-Torres, L., Vernon-Carter, E. J., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzman, N. E., Herrera-Valencia, E. E., Calderas, F., & Jiménez-Alvarado, R. (2011). Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1001-1005.
275. Melgar, B., Dias, M. I., Ciric, A., Sokovic, M., Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., ... & Ferreira, I. (2017). By-product recovery of *Opuntia* spp. peels: Betalainic and phenolic profiles and bioactive properties. *Industrial crops and products*, 107, 353-359.

276. Melo-Silveira, R. F., Fidelis, G. P., Costa, M. S. S. P., Telles, C. B. S., Dantas-Santos, N., Elias, S. D. O., ... & Rocha, H. A. O. (2012). In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 409-426.
277. Mena, P., Tassotti, M., Andreu, L., Nuncio-Jáuregui, N., Legua, P., Del Rio, D., & Hernández, F. (2018). Phytochemical characterization of different prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) cultivars and botanical parts: UHPLC-ESI-MSn metabolomics profiles and their chemometric analysis. *Food Research International*, 108, 301-308.
278. Méndez, L. P., Flores, F. T., Martín, J. D., Rodríguez, E. M. R., & Romero, C. D. (2015). Physicochemical characterization of cactus pads from *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica*. *Food chemistry*, 188, 393-398.
279. Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F. D., & Aguilar, C. N. (2012). Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 445-450.
280. Menezes, L. R., Costa, C. O., Rodrigues, A. C., Santo, F. R., Nepel, A., Dutra, L. M., Silva, F. M., Soares, M. B., Barison, A., Costa, E. V., & Bezerra, D. P. (2016). Cytotoxic Alkaloids from the Stem of *Xylopiopsis laevigata*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(7), 890.
281. Merghem, R., Jay, M., Viricel, M. R., Bayet, C., & Voirin, B. (1995). Five 8-C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*, 38(3), 637-640.
282. Messaid, H., (2008). Optimisation du processus d'immersion –réhydratation du système dates sèche- jus d'orange. Thèse de magistère en Génie Alimentaire. Université M'hamed Bouguara, Boumerdes, Algérie. 74 p.
283. Miguel, M. G. (2018). Betalains in some species of the Amaranthaceae family: A review. *Antioxidants*, 7(4), 53.
284. Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters*, 384(3), 240-242.
285. Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological research*, 152(3), 239-246.
286. Missaoui, M., D'Antuono, I., D'Imperio, M., Linsalata, V., Boukhchina, S., Logrieco, A. F., & Cardinali, A. (2020). Characterization of Micronutrients, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Prickly Pear Cladodes as Functional Ingredient. *Molecules*, 25(9), 2176.
287. Mladěnka, P., Macáková, K., Filipský, T., Zatloukalová, L., Jahodář, L., Bovicelli, P., ... & Saso, L. (2011). In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of inorganic biochemistry*, 105(5), 693-701.
288. Mohd Nor, N. H., Othman, F., Mohd Tohit, E. R., Md Noor, S., Razali, R., Ahmad Hassali, H., & Hassan, H. (2019). In Vitro Antiatherothrombotic Effects of Extracts from *Berberis Vulgaris* L., *Teucrium Polium* L., and *Orthosiphon Stamineus* Benth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
289. Moosazadeh, E., Akhgar, M. R., & Kariminik, A. (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of *Opuntia stricta* F. essential oil. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 4(5), 94-101.

290. Moreno-Indias, I., Sánchez-Alcoholado, L., Pérez-Martínez, P., Andrés-Lacueva, C., Cardona, F., Tinahones, F., & Queipo-Ortuño, M. I. (2016). Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food & function*, 7(4), 1775-1787.
291. Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., & Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26(8), 2231-2234.
292. Mortensen, A., & Skibsted, L. H. (1997). Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS letters*, 417(3), 261-266.
293. Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear. *Innovative food science & emerging technologies*, 7(4), 275-287.
294. Msaddak, L., Abdelhedi, O., Kridene, A., Rateb, M., Belbahri, L., Ammar, E., ... & Zouari, N. (2017). *Opuntia ficus-indica* cladodes as a functional ingredient: bioactive compounds profile and their effect on antioxidant quality of bread. *Lipids in health and disease*, 16(1), 32.
295. Mulas, M. (1992, July). Medicinal properties and yield possibilities of the prickly pear (*Opuntia* spp.) in the Mediterranean environment. In *WOCMAP I-Medicinal and Aromatic Plants Conference: part 3 of 4 331* (pp. 79-84).
296. Mulas, M., & Mulas, G. (2004). Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. *Short and Medium-Term Priority Environmental Action Programme (SMAP)*. Université des études de SASSAR.
297. Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139-148.
298. Murillo Amador, B., & García, A. (2002). *El nopalcultivo forrajero sostenible para el noroeste de México* (No. F/634.775 N6).

N

299. Natividad, L. R., & Rafael, R. R. (2014). Carotenoid analyses and antibacterial assay of annatto (*Bixa orellana* L.), carrot (*Daucus carota* L.), corn (*Zea mays* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) extracts. *Research Journal of Recent Sciences*, 3(3), 40-45.
300. Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology*, 7(12).
301. Neffar, S., & Bediar, A. (2012). *Etude de l'effet de l'âge des plantations de figuier de Barbarie (Opuntia ficus indica L. Miller) sur la variation des ressources naturelles (sol et végétation) des steppes algériennes de l'Est. Cas de Souk Ahras et Tébessa* (Doctoral dissertation, PhD Thesis, Univ. Annaba, Algeria).
302. Nefzaoui, A., & Salem, H. B. (2002). Forage, fodder, and animal nutrition. *Cacti: Biology and uses*, 199-210.

303. Nemes, Z., Dietz, R., Lüth, J. B., Gomba, S., Hackenthal, E., & Gross, F. (1979). The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia*, 35(11), 1475-1476.
304. Nerd, A., Karady, A., & Mizrahi, Y. (1991). Out-of-season prickly pear: fruit characteristics and effect of fertilization and short droughts on productivity. *HortScience*, 26(5), 527-529.
305. Neuman, M. G., Cohen, L., Opris, M., Nanau, R. M., & Hyunjin, J. (2015). Hepatotoxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 18(4), 825-843.
306. Ng, R. C., Kassim, N. K., Yeap, Y. S., Ee, G. C. L., Yazan, S. L., & Musa, K. H. (2018). Isolation of carbazole alkaloids and coumarins from *Aegle marmelos* and *Murraya koenigii* and their antioxidant properties. *Sains Malaysiana*, 47(8), 1749-56.
307. Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M., & Mikkelsen, J. D. (1997). Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 113(1), 83-91.
308. Ning, Z., Liu, Z., Song, Z., Wang, C., Liu, Y., Gan, J., ... & Lu, A. (2017). Application of a strategy based on metabolomics guided promoting blood circulation bioactivity compounds screening of vinegar. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 38.
309. Nobel, P. S. (1999). *Physicochemical & environmental plant physiology*. Academic press.
310. Nobel PS. (1995). Environmental biology. In: Barbera G, Inglese P, Pimienta-Barrios E (eds) Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO Plant Production and Protection 132:36-48.
311. Nobel, P. S., Andrade, J. L., Wang, N., & North, G. B. (1994). Water potentials for developing cladodes and fruits of a succulent plant, including xylem-versus-phloem implications for water movement. *Journal of Experimental Botany*, 45(12), 1801-1807.
312. Normalisation, A. (1993). Produits agricoles et alimentaires. Norme NF V03-040. Assoc. Franç. Normal., Paris France.
313. Noumi, E., Snoussi, M., Hajlaoui, H., Trabelsi, N., Ksouri, R., Valentin, E., & Bakhrouf, A. (2011). Chemical composition, antioxidant and antifungal potential of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils against oral *Candida* species. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(17), 4147-4156.
314. Noureini, S. K., & Wink, M. (2012). Antiproliferative effects of crocin in HepG2 cells by telomerase inhibition and hTERT down-regulation. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(5), 2305-9.
315. Nour-Eldin, F. (1968). Phenols and blood coagulation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2(1), 23-42.
- O**
316. Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., & Barrett, J. F. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3(2), 225-230.
317. Olvera, P., & Romero, C. D. L. P. C. (2006). Atlas de anatomía vegetal./carmen de la paz pérez olvera y jacqueline ceja romero (No. QK641. P47 2006.).

318. Omar, G., Abdallah, L., Barakat, A., Othman, R., & Bourinee, H. (2019). In vitro haemostatic efficacy of aqueous, methanol and ethanol plant extracts of three medicinal plant species in Palestine. *Brazilian Journal of Biology*, (AHEAD).
319. OSAWA, K., YASUDA, H., MARUYAMA, T., MORITA, H., TAKEYA, K., & ITOKAWA, H. (1992). Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 40(11), 2970-2974.
320. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4619-4626.
321. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
322. Oyedapo, O. O., Makinde, A. M., Ilesanmi, G. M., Abimbola, E. O., Akinwunmi, K. F., & Akinpelu, B. A. (2015). Biological activities (anti-inflammatory and anti-oxidant) of fractions and methanolic extract of *Philonotis hastate* (Duby Wijk & MargaDant). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(4), 50-55.
323. Oyedapo, O. O., Akinpelu, B. A., Akinwunmi, K. F., Adeyinka, M. O., & Sipeolu, F. O. (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2(4), 46-51.
324. Oyedapo, O. O., & Famurewa, A. J. (1995). Antiprotease and membrane stabilizing activities of extracts of *Fagara zanthoxyloides*, *Olax subscorpioides* and *Tetrapleura tetraptera*. *International journal of Pharmacognosy*, 33(1), 65-69.

P

325. Paiva, P. M. G., de Souza, I. F. A. C., Costa, M. C. V. V., Santos, A. D. F. S., & Coel, L. C. B. B. (2016). *Opuntia* sp. cactus: biological characteristics, cultivation and applications. *Advances in Research*, 1-14.
326. Palace, V. P., Khaper, N., Qin, Q., & Singal, P. K. (1999). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(5-6), 746-761.
327. Paolini, M., Antelli, A., Pozzetti, L., Spetlova, D., Perocco, P., Valgimigli, L., ... & Cantelli-Forti, G. (2001). Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats. *Carcinogenesis*, 22(9), 1483-1495.
328. Parekh, J., & CHANDA, S. (2008). Antibacterial activities of aqueous and alcoholic extracts of 34 Indian medicinal plants against some *Staphylococcus* species. *Turkish journal of Biology*, 32(1), 63-71.
329. Pérez-Torrero, E., Garcia-Tovar, S. E., Luna-Rodriguez, L. E., & RodríguezGarcia, M. E. (2017). Chemical Composition of Prickly Pads from (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller Related to Maturity Stage and Environment. *International Journal of Plant Biology & Research*.
330. Petruczynik, A. (2012). Analysis of alkaloids from different chemical groups by different liquid chromatography methods. *Open Chemistry*, 10(3), 802-835.

331. Picerno, P., Mencherini, T., Sansone, F., Del Gaudio, P., Granata, I., Porta, A., & Aquino, R. P. (2011). Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: composition and antioxidant and antifungal activities. *Journal of ethnopharmacology*, 138(3), 705-712.
332. Piga, A. (2004). Cactus pear: a fruit of nutraceutical and functional importance. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 6, 9-22.
333. Pimienta-Barrios, E., Cornejo, SL et del Castillo-Aranda, MEG (2003). Caractérisation anatomique et conductivité hydraulique théorique des éléments de vaisseaux des variétés sauvages et cultivées de nopal de Las Tunas (*Opuntia*). *Acta Botánica Mexicana* , (62), 21-30.
334. Pimienta-Barrios, E. (1993). Vegetable cactus (*Opuntia*). *Pulses and Vegetables*, Chapman & Hall, London, 1993, 177-191.
335. Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraigne, J. O. (1999). Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prévention. *Cancérologie*, 95, 1-4.
336. Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., & Jerala, R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and biophysical research communications*, 306(2), 530-536.
337. Pomin V. H. (2014). Marine medicinal glycomics. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 5.
338. Pompeu, D. G., Mattioli, M. A., RIBEIRO, R. I. M. D. A., Goncalves, D. B., MAGALHÃES, J. T. D., Marangoni, S., ... & Granjeiro, P. A. (2015). Purification, partial characterization and antimicrobial activity of lectin from *Chenopodium quinoa* seeds. *Food Science and Technology*, 35(4), 696-703.
339. POOJA, S., & VIDYASAGAR, G. (2016). Antimicrobial Activity of *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill Fruit and Cladode Extracts. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, 84.
340. Pooja, S., & Vidyasagar, G. M. (2016). Phytochemical screening for secondary metabolites of *Opuntia dillenii* Haw. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(5), 39-43.
341. Prakasia, P. P., & Nair, A. S. (2016). Evaluation of in vitro antioxidant potential of the total crude alkaloid extract of *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) Correa leaves. *Int J Pharm Pharm Sci*, 8, 85-91.
342. Pritchard, H. N., & Hall, J. A. (1976). The chemical composition of glochids from *Opuntia*. *Canadian Journal of Botany*, 54(1-2), 173-176.
343. Putnam, K. P., Bombick, D. W., & Doolittle, D. J. (2002). Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 16(5), 599-607.

R

344. Račková, L., Májeková, M., Košťálová, D., & Štefek, M. (2004). Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(17), 4709-4715.
345. Rahman, H., Eswaraiah, M. C., & Dutta, A. M. (2015). In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza Sativa* Var. joha rice (an aromatic indigenous rice of Assam). *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 15, 115-121.

346. Ramadan, M. F., & Mörsel, J. T. (2003). Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). *Food chemistry*, 82(3), 339-345.
347. Ramírez-Moreno, E., Cariño-Cortés, R., Cruz-Cansino, N. D. S., Delgado-Olivares, L., Ariza-Ortega, J. A., Montañez-Izquierdo, V. Y., ... & Filardo-Kerstupp, T. (2017). Antioxidant and antimicrobial properties of cactus pear (*Opuntia*) seed oils. *Journal of Food Quality*, 2017.
348. Ramos, F. A., Takaishi, Y., Shirotori, M., Kawaguchi, Y., Tsuchiya, K., Shibata, H., ... & Takeuchi, M. (2006). Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(10), 3551-3557.
349. Ramulu, P., & Rao, P. U. (2003). Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *Journal of food composition and analysis*, 16(6), 677-685.
350. Rasola, A., & Bernardi, P. (2014). The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells. *Cell calcium*, 56(6), 437-445.
351. Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2017). The two faces of reactive oxygen species in cancer. *The Annual Review of Cancer Biology*. 1:79–98
352. Reddy, M. K., Alexander-Lindo, R. L., & Nair, M. G. (2005). Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(23), 9268-9273.
353. Repetto, G., Del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7), 1125.
354. Reshma, A. K., & Brindha, P. (2014). In vitro anti-inflammatory, antioxidant and nephroprotective studies on leaves of *Aegle marmelos* and *Ocimum sanctum*. *Asian J Pharm Clin Res*, 7(4).
355. Retamal, N., Durán, J. M., & Fernández, J. (1987). Seasonal variations of chemical composition in prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) miller). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 38(4), 303-311.
356. Reyes-Agüero, J. A., & Valiente-Banuet, A. (2006). Reproductive biology of *Opuntia*: a review. *Journal of arid environments*, 64(4), 549-585.
357. Reyes-Agüero, J. A., Aguirre-Rivera, J. R., & Hernández, H. M. (2005). Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L) Mill.(CACTACEAE). *Agrociencia*, 39(4), 395-408.
358. Ricard, F., Abe, E., Duverneuil-Mayer, C., Charlier, P., de la Grandmaison, G., & Alvarez, J. C. (2012). Measurement of atropine and scopolamine in hair by LC–MS/MS after *Datura stramonium* chronic exposure. *Forensic science international*, 223(1-3), 256-260.
359. Rice-Evans, C. A., Sampson, J., Bramley, P. M., & Holloway, D. E. (1997). Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo?. *Free radical research*, 26(4), 381-398.
360. Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of chromatography A*, 1000(1-2), 657-691.
361. Robinson, H. (1974). Scanning electron microscope studies of the spines and glochids of the *Opuntioideae* (Cactaceae). *American Journal of Botany*, 61(3), 278-283.

362. Rocchetti, G., Pellizzoni, M., Montesano, D., & Lucini, L. (2018). Italian *Opuntia ficus-indica* cladodes as rich source of bioactive compounds with health-promoting properties. *Foods*, 7(2), 24.
363. Rodier J., (1997). L'analyse de l'eau, eau naturelle, eau résiduaire, eau de mer. 8ème Ed. Dunod. France. 57- 65pp.
364. Rodriguez-Felix, A. (2000, October). Postharvest physiology and technology of cactus pear fruits and cactus leaves. In *IV International Congress on Cactus Pear and Cochineal 581* (pp. 191-199).
365. Rodríguez-Felix, A., & Cantwell, M. (1988). Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant foods for Human nutrition*, 38(1), 83-93.
366. Rodziewicz, P., Swarczewicz, B., Chmielewska, K., Wojakowska, A., & Stobiecki, M. (2014). Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(1), 1-19.
367. Rösner, H., Williams, L. A. D., Jung, A., & Kraus, W. (2001). Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1540(2), 166-177.
368. Roy, M. K., Thalang, V. N., Trakoontivakorn, G., & Nakahara, K. (2005). Mahanine, a carbazole alkaloid from *Micromelum minutum*, inhibits cell growth and induces apoptosis in U937 cells through a mitochondrial dependent pathway. *British journal of pharmacology*, 145(2), 145–155.
369. Runha, F. P., Cordeiro, D. S., Pereira, C. A. M., Vilegas, J., & Oliveira, W. P. (2001). Production of dry extracts of medicinal Brazilian plants by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during the drying operation. *Food and bioproducts processing*, 79(3), 160-168.
370. Ryu, R., Jung, U. J., Kim, H. J., Lee, W., Bae, J. S., Park, Y. B., & Choi, M. S. (2013). Anticoagulant and antiplatelet activities of *artemisia princeps* Pampanini and its bioactive components. *Preventive nutrition and food science*, 18(3), 181.

S

371. Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?. *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 709-721.
372. Sadok, T. H., Aid, F., Bellal, M., & HUSSAIN, M. S. A. (2008). Composition chimique des jeunes cladodes d'*Opuntia ficus indica* et possibilités de valorisation alimentaire. *Agricultura*, 65(1-2).
373. Sáenz, C., Berger, H., Rodríguez-Félix, A., Galletti, L., Corrales García, J., & Sepúlveda, E. (2013). Agro-industrial utilization of cactus pear. Food and Agriculture Organization, Rome.
374. Saénz, C., Berger, H., Corrales García, J., Galletti, L., Garcia del Cortazar, V., Higuera, I., Mondragón, C., Rodríguez Feliz, A., Sepulveda, E. & Varnero M.T. (2006). Utilización agroindustrial del nopal. *FAO Plant Production and Protection Paper No. 162*. Rome, FAO. 165 pp.
375. Saenz, C. (2000). Processing technologies: an alternative for cactus pear (*Opuntia* spp.) fruits and cladodes. *Journal of Arid Environments*, 46(3), 209-225.

376. Sajeva, M., & Mauseth, J. D. (1991). Leaf-like structure in the photosynthetic, succulent stems of cacti. *Annals of Botany*, 68(5), 405-411.
377. Salem, H. B., Abdouli, H., Nefzaoui, A., El-Mastouri, A., & Salem, L. B. (2005). Nutritive value, behaviour, and growth of Barbarine lambs fed on oldman saltbush (*Atriplex nummularia* L.) and supplemented or not with barley grains or spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis*) pads. *Small Ruminant Research*, 59(2-3), 229-237.
378. Salem, H. B., Nefzaoui, A., & Salem, L. B. (2002). Supplementation of *Acacia cyanophylla* Lindl. Foliage-based diets with barley or shrubs from arid areas (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis* and *Atriplex nummularia* L.) on growth and digestibility in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 96(1-2), 15-30.
379. Salem-Fnayou, A. B., Zemni, H., Nefzaoui, A., & Ghorbel, A. (2014). Micromorphology of cactus-pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) cladodes based on scanning microscopies. *Micron*, 56, 68-72.
380. Sánchez, E., Dávila-Aviña, J., Castillo, S. L., Heredia, N., Vázquez-Alvarado, R., & García, S. (2014). Antibacterial and antioxidant activities in extracts of fully grown cladodes of 8 cultivars of cactus pear. *Journal of food science*, 79(4), M659-M664.
381. Sánchez, E., Morales, C. R., Castillo, S., Leos-Rivas, C., García-Becerra, L., & Martínez, D. M. O. (2016). Antibacterial and antibiofilm activity of methanolic plant extracts against nosocomial microorganisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2016.
382. Sánchez, E., García, S., & Heredia, N. (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6888-6894.
383. Sanchez-Gonzalez, N., Jaime-Fonseca, M. R., San Martin-Martinez, E., & Zepeda, L. G. (2013). Extraction, stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* cv. using response surface methodology. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 61(49), 11995-12004.
384. Sánchez-Rodríguez, E., Ruiz, J. M., Ferreres, F., & Moreno, D. A. (2012). Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique. *Food chemistry*, 134(2), 775-782.
385. Sangeetha, M., Kousalya, K., Lavanya, R., Sowmya, C., Chamundeeswari, D., & Maheswara, U. C. (2011). In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of leaves of *Cleodendron inerme*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and chemical sciences*, 2(1), 822-827.
386. Sanjay, C. P., Sheth, N. R., Rathod, I. S., Suhagia, B. N., & Maradia, R. B. (2013). Analysis of betalains from fruits of *Opuntia* species. *Phytochemistry reviews*, 12(1), 35-45.
387. Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M. M., & Toth-Markus, M. (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, 38(8-9), 1023-1029.
388. Savaroglu, F., Ilhan, S., & Filik-Isçen, C. (2011). An evaluation of the antimicrobial activity of some Turkish mosses. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(14), 3286-3292.
389. Sawaya, W. N., Khalil, J. K., & Al-Mohammad, M. M. (1983). Nutritive value of prickly pear seeds, *Opuntia ficus-indica*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 33(1), 91-97.

390. Scheinvar, L. (1995). Taxonomy of utilized Opuntias. *FAO Plant Production and Protection Paper (FAO)*.
391. Schweizer, M. (1999). *Docteur Nopal: médecin du bon Dieu*. APB, Aloe plantes et beauté.
392. Sepúlveda, E., & Sáenz, C. (1988). Industrialización de la tuna (*Opuntia ficus-indica*). I. Aceite de la semilla. *Alimentos*, 13(1), 35-38.
393. Shah, M. R., Imran, M., & Ullah, S. (2019). *Nanocarriers for Cancer Diagnosis and Targeted Chemotherapy*. Elsevier.
394. Shanmugam, M., & Mody, K. H. (2000). Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current science*, 1672-1683.
395. Shedbalkar, U. U., Adki, V. S., Jadhav, J. P., & Bapat, V. A. (2010). Opuntia and other cacti: applications and biotechnological insights. *Tropical Plant Biology*, 3(3), 136-150.
396. Shobharani, P., Nanishankar, V. H., Halami, P. M., & Sachindra, N. M. (2014). Antioxidant and anticoagulant activity of polyphenol and polysaccharides from fermented *Sargassum* sp. *International journal of biological macromolecules*, 65, 542-548.
397. Siddhuraju, P., Mohan, P. S., & Becker, K. (2002). Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food chemistry*, 79(1), 61-67.
398. Siems, W., Sommerburg, O., Schild, L., Augustin, W., Langhans, C. D., & Wiswedel, I. (2002). β -Carotene cleavage products induce oxidative stress in vitro by impairing mitochondrial respiration. *The FASEB Journal*, 16(10), 1289-1291.
399. Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*, 4, 180-183.
400. Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1315S-1321S.
401. Singh, R., & Cuervo, A. M. (2011). Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell metabolism*, 13(5), 495-504.
402. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
403. Sirk, T. W., Friedman, M., & Brown, E. F. (2011). Molecular binding of black tea theaflavins to biological membranes: relationship to bioactivities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 3780-3787.
404. Skadhauge, B., Gruber, M. Y., Thomsen, K. K., & Von Wettstein, D. (1997). Leucocyanidin reductase activity and accumulation of proanthocyanidins in developing legume tissues. *American Journal of Botany*, 84(4), 494-503.
405. Slimen, I. B., Najjar, T., & Abderrabba, M. (2016). *Opuntia ficus-indica* as a source of bioactive and nutritional phytochemicals. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 4(6), 162-169.
406. Smith, A. H., Zoetendal, E., & Mackie, R. I. (2005). Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial ecology*, 50(2), 197-205.

407. Soberón, J., Golubov, J., & Sarukhán, J. (2001). The importance of *Opuntia* in Mexico and routes of invasion and impact of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae). *Florida Entomologist*, 486-492.
408. Song, Q., Wang, S., & Zhao, W. (2012). Total steroidal alkaloids from *Veratrum patulum* L. Inhibit platelet aggregation, thrombi formation and decrease bleeding time in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 141(1), 183-186.
409. Soualem, S., Adda, A., Belkhodja, M., & Merah, O. (2014). Calcium supply reduced effect of salinity on growth in the Mediterranean shrub (*Atriplex halimus* L.). *Life Science Journal*, 11(2), 278-284.
410. Staack, R. F., & Maurer, H. H. (2005). Metabolism of designer drugs of abuse. *Current drug metabolism*, 6(3), 259-274.
411. Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 345-351.
412. Stahl, W., Junghans, A., de Boer, B., Driomina, E. S., Briviba, K., & Sies, H. (1998). Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS letters*, 427(2), 305-308.
413. Stapleton, P. D., Shah, S., Hamilton-Miller, J. M., Hara, Y., Nagaoka, Y., Kumagai, A., ... & Taylor, P. W. (2004). Anti-Staphylococcus aureus activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins. *International journal of antimicrobial agents*, 24(4), 374-380.
414. Stead, D. (1994). The effect of chlorogenic, gallic and quinic acids on the growth of spoilage strains of *Lactobacillus collinoides* and *Lactobacillus brevis*. *Letters in applied microbiology*, 18(2), 112-114.
415. Stead, D. (1993). The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of applied bacteriology*, 75(2), 135-141.
416. Stintzing, F. C., & Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular nutrition & food research*, 49(2), 175-194.
417. Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., ... & Felker, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 442-451.
418. Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2003). Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *European Food Research and Technology*, 216(4), 303-311.
419. Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*, 10(1-3), 1881-1896.
420. Subhashini, N., Thangathirupathi, A., & Lavanya, N. (2011). Antioxidant activity of *Trigonella foenum graecum* using various in vitro and ex vivo models. *Int J pharm pharm Sci*, 3(2), 96-102.
421. Sudzuki Hills, F. (1995). Anatomy and morphology. *FAO Plant Production and Protection Paper (FAO)*.
422. Suffness, M. and J.M. Pezzuto, 1990. Assays Related to Cancer Drug Discovery. In: Assays for Bioactivity (Methods in Plant Biochemistry, Volume 6), Hostettmann, K. (Ed.). Chapter 4, Academic Press, London, UK., ISBN-13: 9780124610163, pp: 71-133.

423. Sundaram, S., Radhakrishnan, A., Kanniappan, G. V., Bhaskaran, S. K., Palanisamy, C. P., & Kannappan, P. (2015). Comparative Study on Antioxidant Activity of Crude and Alkaloid Extracts of *Hybanthus enneaspermus* Linn) F. Mull. *Analytical Chemistry Letters*, 5(5), 291-299.
424. Surai, P. F. (2002). *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction* (pp. 5-9). Nottingham: Nottingham University Press.
425. Surai, P. F., Speake, B. K., & Sparks, N. H. C. (2001). Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 2. Antioxidant properties and discrimination in embryonic tissues. *The Journal of Poultry Science*, 38(2), 117-145.
426. Sznarkowska, A., Kostecka, A., Meller, K., & Bielawski, K. P. (2017). Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget*, 8(9), 15996.

T

427. Tarahovsky, Y. S., Kim, Y. A., Yagolnik, E. A., & Muzafarov, E. N. (2014). Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(5), 1235-1246.
428. Tatsimo, S. J. N., de Dieu Tamokou, J., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J., ... & Tane, P. (2012). Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research notes*, 5(1), 1-6.
429. Tatti, P. N., Anitha, S., Shashidhara, S., Deepak, M., & Bidari, S. (2012). Evaluation of in-vitro anti-denaturation activity of isolated compound of *Butea monosperma* bark. *Pharm Sci Monitor*, 3, 2314-20.
430. Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., & Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(10), 3133-3141.
431. Teles, F. F., Stull, J. W., Brown, W. H., & Whiting, F. M. (1984). Amino and organic acids of the prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(4), 421-425.
432. Tenore, G. C., Novellino, E., & Basile, A. (2012). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Journal of functional foods*, 4(1), 129-136.
433. Terrill, T. H., Rowan, A. M., Douglas, G. B., & Barry, T. N. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58(3), 321-329.
434. Tesoriere, L., Butera, D., Allegra, M., Fazzari, M., & Livrea, M. A. (2005). Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1266-1270.
435. Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., & Livrea, M. A. (2004a). Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 80(4), 941-945.
436. Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M., & Livrea, M. A. (2004b). Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *The American journal of clinical nutrition*, 80(2), 391-395.

437. Tesoriere, L., Butera, D., D'arpa, D., Di Gaudio, F., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2003). Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free radical research*, 37(6), 689-696.
438. Thlija, B. (1987). *Nutritional value of several Opuntia species* (Doctoral dissertation, Thesis. Corvallis, OR, USA: Oregon State University).
439. Tian, B., Sun, Z., Shen, S., Wang, H., Jiao, J., Wang, L., ... & Hua, Y. (2009). Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. *Letters in applied microbiology*, 49(6), 689-694.
440. Tirilly, Y., & Bourgeois, C. M. (1999). *Technologie des légumes*. Editions Tec & Doc.
441. Toure, H., Bouatia, M., Idrissi, M. O., & Draoui, M. (2015). Phytochemical screening and antioxidant activity of aqueous-ethanolic extracts of *Opuntia ficus indica*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(7), 409-415.
442. Tsafantakis, N., Katsanou, E. S., Kyriakopoulou, K., Psarou, E. C., Raptaki, I., Skaltsounis, A. L., ... & Fokialakis, N. (2019). Comparative UHPLC-HRMS Profiling, Toxicological Assessment, and Protection Against H₂O₂-Induced Genotoxicity of Different Parts of *Opuntia ficus indica*. *Journal of Medicinal Food*, 22(12), 1280-1293.
443. Tsao R., Deng A. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals.
444. Tsuchiya, H., Sato, M., Iinuma, M., Yokoyama, J., Ohyama, M., Tanaka, T., ... & Namikawa, I. (1994). Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant falvanones. *Experientia*, 50(9), 846-849.
445. Tu, M., Sun, S., Wang, K., Peng, X., Wang, R., Li, L., Zeng, S., Zhou, H., & Jiang, H. (2013). Organic cation transporter 1 mediates the uptake of monocrotaline and plays an important role in its hepatotoxicity. *Toxicology*, 311(3), 225-230.
446. Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G. G., George, T., Leonczak, J., Gibson, G. R., ... & Spencer, J. P. (2008). Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *British Journal of Nutrition*, 99(4), 782-792.

U

447. Umapathy, E., Ndebia, E. J., Meeme, A., Adam, B., Menziwa, P., Nkeh-Chungag, B. N., & Iputo, J. E. (2010). An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(9), 789-795.
448. Usman, H., Abdulrahman, F. I., & Usman, A. (2009). Qualitative phytochemical screening and in vitro antimicrobial effects of methanol stem bark extract of *Ficus thonningii* (Moraceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 6(3).
449. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
450. Utra, A. M., & Hasan, U. H. (2017). Anti-arthritis activity of aqueous-methanolic extract and various fractions of *Berberis orthobotrys* Bien ex Aitch. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 371.

V

451. Vázquez-Espinal, A., Yañez, O., Osorio, E., Areche, C., García-Beltrán, O., Ruiz, L. M., ... & Tiznado, W. (2019). Theoretical study of the antioxidant activity of quercetin oxidation products. *Frontiers in chemistry*, 7, 818.
452. Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Vulić, J. J., & Đilas, S. M. (2011). Antibacterial activity of *Beta vulgaris* L. pomace extract. *Acta periodica technologica*, (42), 263-269.
453. Ventura-Aguilar, R. I., Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños, S., & Rivera-Cabrera, F. (2017). Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(15), 5065-5073.
454. Verma, A. M., Kumar, A., Kavitha, D., & Anurag, K. B. (2011). Antidenaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* in-vitro. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(2), 1-6.
455. Vignon, M. R., Heux, L., Malainine, M. E., & Mahrouz, M. (2004). Arabinan–cellulose composite in *Opuntia ficus-indica* prickly pear spines. *Carbohydrate Research*, 339(1), 123-131.
456. Vijaya, D., & Thangaraj, N. (2019). Extraction of betalains from Red Beetroot (*Beta vulgaris* L.) and to evaluate its antibacterial potential against Extended-spectrum betalactamases producing isolates. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(6), 2422-2425.
457. Vinchurkar, A. S., Valsange, A. B., Dama, L. B., Sonawane, S. R., Gaikwad, N. G., Mane, P. P., & Dama, S. B. (2014). evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity of crude lawsonia inermis leaf extract using egg albumin denaturation assay.

W

458. Waghorn, G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), 116-139.
459. Waldron, K. W., Parr, A. J., Ng, A., & Ralph, J. (1996). Cell wall esterified phenolic dimers: identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochemical analysis*, 7(6), 305-312.
460. Wang, X.B., Cheng, H., Zhao, Y., Huang, H.T. (2011). Study on the EGCG from tea on the blood anticoagulation effect of mice. *Journal of Tea Science*, 31, 532-6.
461. Wang, J., Green, P. S., & Simpkins, J. W. (2001). Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry*, 77(3), 804-811.
462. Ward, F. E., Garling, D. L., Buckler, R. T., Lawler, D. M., & Cummings, D. P. (1981). Antimicrobial 3-methylene flavanones. *Journal of medicinal chemistry*, 24(9), 1073-1077.
463. Watjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkotter, A., ... & Kahl, R. (2005). Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *The Journal of nutrition*, 135(3), 525-531.
464. Weinberg, S. E., & Chandel, N. S. (2015). Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature chemical biology*, 11(1), 9.

465. Welegerima, G., Zemene, A., & Tilahun, Y. (2018). Phytochemical composition and antibacterial activity of *Opuntia ficus indica* cladodes extract. *Journal of medicinal plant studies*, 6(2), 243-246.
466. Wendakoon, C., Calderon, P., & Gagnon, D. (2012). Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1(2), 60-68.
467. Williams, L. A. D., O'Connar, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J. A., ... & Kraus, W. (2008). The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Medical Journal*, 57(4).
468. Williams, L. A. D., Vasquez, E. A., Milan, P. P., Zebitz, C., & Kraus, W. (2002). In vitro anti-inflammatory and antimicrobial activities of phenylpropanoids from Piper betle L. (Piperaceae). In *Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application* (pp. 221-227). Springer, Dordrecht.
469. Willis, R. (1998). Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst*, 123(3), 435-439.
470. Winkler, C., Wirleitner, B., Schroeks-nadel, K., Schennach, H., & Fuchs, D. (2005). In vitro effects of beet root juice on stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1(4), 180-185.
471. Winckler J. (1974). Vitalfärbung von Lysosomen und anderen Zellorganellen der Ratte mit Neutralrot [Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red (author's transl)]. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 6(3), 1-91.
472. Woodall, A. A., Britton, G., & Jackson, M. J. (1997). Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1336(3), 575-586.

Y

473. Yadegari, M. H., Nasrollahi, Z., & Moazeni, S. M. (2009). Antifungal effect of green tea leaf (*Camellia sinensis*) polyphenols on *Candida albicans*. *Pathobiology Research*, 12(3), 71-77.
474. Yaping, Z., Wenli, Y., Weile, H., & Ying, Y. (2003). Anti-inflammatory and anticoagulant activities of lycopene in mice. *Nutrition Research*, 23(11), 1591-1595.
475. Yeddes, N., Chérif, J. K., Guyot, S., Sotin, H., & Ayadi, M. T. (2013). Comparative study of antioxidant power, polyphenols, flavonoids and betacyanins of the peel and pulp of three Tunisian *Opuntia* forms. *Antioxidants*, 2(2), 37-51.
476. Yoon, J. H., & Baek, S. J. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei medical journal*, 46(5), 585-596.
477. Yubin, J. I., Miao, Y., Bing, W., & Yao, Z. (2014). The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine. *J Chem Pharm Res*, 6(1), 338-45.

Z

478. Zaghdoudi, K. (2015). Optimisation de l'extraction des caroténoïdes à partir du persimmon (*Diospyros kaki* L.), de l'abricot (*Prunus armeniaca* L.) et de la pêche

- (*Prunus persica* L.): étude photophysique en vue d'une application en thérapie photodynamique (PDT) (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
479. Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*, 138(1), 103–141.
480. Zarrin, M., Amirrajab, N., & Sadeghi-Nejad, B. (2010). In vitro antifungal activity of *Satureja Khuzestanica* Jamzad against *Cryptococcus neoformans*. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 26(4).
481. Zenteno-Ramirez, G., Juárez-Flores, B. I., Aguirre-Rivera, J. R., Monreal-Montes, M., García, J. M., Serratos, M. P., ... & Rendon-Huerta, J. A. (2018). Juices of prickly pear fruits (*Opuntia* spp.) as functional foods. *Italian Journal of Food Science*, 30(3).
482. Zhang, G., Wang, L., & Pan, J. (2012). Probing the binding of the flavonoid diosmetin to human serum albumin by multispectroscopic techniques. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(10), 2721-2729.
483. Zhang, P., & Omaye, S. T. (2001). Antioxidant and prooxidant roles for β -carotene, α -tocopherol and ascorbic acid in human lung cells. *Toxicology in vitro*, 15(1), 13-24.
484. Zhou, S., Gao, Y., Jiang, W., Huang, M., Xu, A., & Paxton, J. W. (2003). Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug metabolism reviews*, 35(1), 35-98.
485. Zielińska-Przyjemska, M., Olejnik, A., Dobrowolska-Zachwieja, A., Łuczak, M., & Baer-Dubowska, W. (2016). DNA damage and apoptosis in blood neutrophils of inflammatory bowel disease patients and in Caco-2 cells in vitro exposed to betanin. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej*, 70.
486. Zong, S., Ji, J., Li, J., Yang, Q. H., & Ye, M. (2017). Physicochemical properties and anticoagulant activity of polyphenols derived from *Lachnum singerianum*. *Journal of food and drug analysis*, 25(4), 837-844.
487. Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, 552, 50–59.

Publication

**REGULAR ARTICLE**

Biological Properties of Betalains extracted from inermis nopals of Algerian *Opuntia ficus indica* (L.)

Moussaoui Badreddine, Rahali Abdellah, Bouamar Sarah and Riaz Ali*

Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS),
Département des Sciences Alimentaires, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn
Badis, Rue Houcine Hamadou, BP 300, Mostaganem 27000, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 6 May 2020

Revised: 16 Jun 2020

Accepted: 17 Jun 2020

***Corresponding Author:**

Email: ardz22003@yahoo.fr

Telephone: +213 550 20 43 65

FAX: +213 45 36 65 01

Keywords: *Opuntia*, nopals, betalains, antioxidant, anti-inflammatory, anticoagulant

ABSTRACT

The nopals of *Opuntia ficus indica*, used traditionally as a valuable vegetable, present a vegetative part highly rich in biomolecules such as betalain pigments. In order to reveal a possible use of these nopals as nutraceutical, in modern medicine or cosmetics, this study was conducted to quantify the betalains in inermis nopals of Algerian *Opuntia*, and highlighted their biological antioxidant, anti-inflammatory and anticoagulant activities in vitro. The yield of betalains extraction was 0.04% which equaled to 48.13±2.2 mg/100g dry weight (DW). The nopal's betalains showed a high antioxidant ability with a DPPH scavenging activity (IC₅₀ =104.89 µg/mL), a reducing power (absorbance = 0.901 ± 0.065) and a maximum inhibition of β-carotene bleaching equivalent to 64.88%. These pigments exhibit a pertinent in vitro anti-inflammatory activity. Moreover, betalains prevent protein (BSA) denaturation and stabilize erythrocyte membrane at levels of 95.51±2.16% and 66.79±1.09%, respectively. In this work, betalains missed of anticoagulant efficacy since the clotting times registered were similar or even less than those of control. The above results clearly suggest that *Opuntia* nopals, with their content of betalains, can be considered as functional food that can provide health effects for the consumer.

1. Introduction

The *Opuntia ficus-indica* (L.), commonly known as prickly pear cactus, is a perennial tropical or subtropical plant belonging to the Cactaceae family. This species has a strong capacity for morphophysiological adaptation to extreme environmental conditions and is widely distributed in arid and semi-arid climates of the Mediterranean and Central America areas (Stintzing and Carle, 2005; Ginestra et al., 2009). This plant is available in the North and highlands of Algeria where it is considered as a fresh source of feed for cattle and fruits

highly appreciated by the population. The thick and succulent paddle-like parts of the *Opuntia* plant are named Cladodes (Heuzé and Tran, 2017). They recently received an ever increasing attention from researchers and economics worldwide for their multivalent nutritional and pharmaceutical potentials (Belhadj Slimen et al., 2017). The young edible cladodes called "nopals" are considered as functional food or medicinal plants owing to their large amount of active ingredients, including polyphenols, flavonoids, carotenoids, alkaloids and betalains (Stintzing and Carle, 2005; Hernández-Urbiola et al., 2011; Suryawanshi and Vidyasagar, 2016; De

Wit et al., 2019).

Betalains are natural water-soluble pigments present in a limited number of plant families, belonging to the order of Caryophyllales such as the genus *Opuntia* (Gandía-Herrero and García-Carmona, 2013, Betancourt et al., 2017). These bio-compounds have the betalamic acid as a basic structural unit, which forms the yellow-orange betaxanthins class by condensation with different amino acids or free amine groups, while it gives the red-purple betacyanins class after conjugation with indoline derivatives (Gandía-Herrero and García-Carmona, 2013). Based on their structural characteristics and light-absorption properties, 78 betalain's types have been identified in plants. The concomitant presence of the two classes generates a wide range of shades, covering the yellow, orange, red, pink and purple colors specific of different parts of betalain-containing plants (Gandía-Herrero and García-Carmona, 2013; Slimen et al., 2017; Cabanes et al., 2019). Besides the use of betalains in industry as food additive, impressive bioactive properties have been bestowed to these bio-colorants (Cabanes et al., 2019). In this way, the natural raw materials rich in betalains like *Opuntia* plants can be considered as functional food or medicinal plants. Given that inermis nopals are widespread but still insufficiently studied in Algeria, in particular their interest in the supply of molecules such as betalains, a better understanding of the availability and bioactivity of these phytochemicals is needed to promote the extension of the local culture of this multi-interest plant.

The objective of this study was to measure the betalain content in inermis Algerian *Opuntia* young cladodes called nopals, and provide more information about their in vitro antioxidant, anti-inflammatory and anticoagulant efficiency.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, chemicals and reagents

2.1.1. Plant material

The inermis nopals less than 3 months of age and also 12-20cm length and 6-9cm width, were collected in November 2017 from wild *Opuntia ficus indica* plants (fig.1) located in Tissemsilt (35°36'25" N and 1°48'38" E) Algeria, and then identified at the Faculty of Natural and Life Science, University of Mostaganem-Algeria. After removing spines, the nopals have been disinfected with 10% (W/V) sodium hypochlorite and cleaned using distilled water

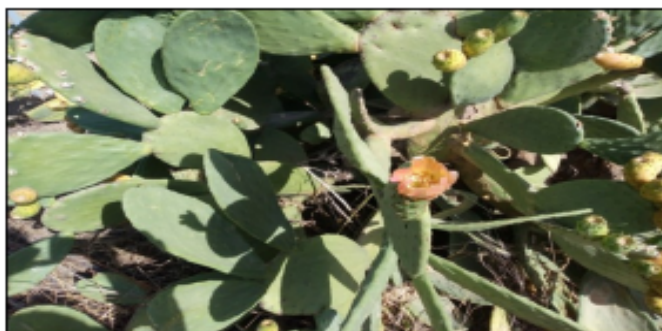


Figure 1: Image of the Algerian inermis species of *Opuntia ficus indica* in the sampling area.

in order to be dried and stored at -20°C.

2.1.2. Reagents

Methanol, ethanol, trichloroacetic acid ($\geq 98\%$), chloroform, sodium chloride (NaCl), iron (III) chloride (FeCl_3), calcium chloride (CaCl_2) and sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) were all of analytical grade and were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). 2,2-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), potassium hexacyanoferrate [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], Ascorbic acid, β -carotene, linoleic acid, diclofenac sodium, APTT reagent, PT reagent, Bovine Serum Albumin (BSA) (lyophilized powder $\geq 98.0\%$) of biochemical grade were provided from Merck Millipore (Darmstadt, Germany).

2.1.3. Preparation of betalain extract

The samples were sliced, dried at 40°C for 7 days and powdered at 1000 rpm. The sieving at 0.85 mm gave a fine and homogeneous powder which was protected from light and air. The protocol of Castellanos-Santiago and Elhadi (2008) was followed to extract betalains from Algerian nopals. 100mg of nopal's powder was stirred in 20 mL of distilled water for 10min in darkness. The supernatant obtained by centrifugation of samples at 12000 \times g for 15 min at 15 °C, was filtered through a 0.45 μm nylon filter. The betalain content (BC) was calculated as reported by Stintzing et al. (2003):

$$\text{BC (mg/L)} = (\text{A} \times \text{DF} \times \text{MW} \times 1000) / (\epsilon \times \text{l})$$

Where A: is the absorbance, DF the dilution factor and l the path length of the cuvette (1 cm). The molecular weight (MW) and the molar extinction coefficient of betanin were applied for quantification of betacyanins (MW = 550 g/mol; ϵ = 60,000 L/mol.cm; λ = 538 nm). Similarly, the indaxanthin was used to quantify the betaxanthins (MW = 308 g/mol; ϵ = 48,000 L/mol.cm; λ = 480 nm).

2.2. Antioxidant activity

2.2.1. DPPH radical-scavenging activity

This assay was carried out as described by Blios (1958). The mixture of 1 mL betalains at different concentrations (31.25 - 250 µg/mL) and 1 mL of ethanolic DPPH solution (0.06 mM) was left 30 min in the dark at 27°C. The absorbance was read at 517 nm against a negative control prepared with pure ethanol and compared to ascorbic acid (positive control) prepared in the same concentrations. The antioxidant efficiency was calculated as follow:

$$IE\% = 100 \cdot [A_{(\text{Control})} - A_{(\text{Sample})}] / A_{(\text{Control})}$$

IE% : percentage of Inhibitory Efficiency, $A_{(\text{control})}$: absorbance of control, $A_{(\text{sample})}$: absorbance of betalains or ascorbic acid. The concentration of betalains or ascorbic acid giving 50% of DPPH scavenging activity called IC50 was estimated graphically [% inhibition = f (concentration)].

2.2.2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The slightly modified method of Oyaizu (1986) was used for FRAP determination. 200 µL of betalain solution (15.75, 31.25, 62.5, 125 and 250 µg/mL) were mixed with 500 µL of phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) and 500 µL of 1% (P/V) potassium hexacyanoferrate [$K_3Fe(CN)_6$]. 500 µL of 10% (V/V) trichloroacetic acid were added to the previous mixture heated 20 min at 50°C, and then centrifuged 10 min at 3000 rpm. 500 µL of the recovered supernatant were mixed consequently with 500 µL of distilled water and 100 µL of 1% (W/V) $FeCl_3$ fresh solution. The absorbance was measured at 700 nm against a methanolic blank and compared to ascorbic acid as positive antioxidant. There is a linear relation between the increase of absorbance and that of the reducing power of betalains.

2.2.3. β -carotene bleaching by linoleic acid assay

The protocol of Kartal et al. (2007) was performed for this analysis. 25 µL of linoleic acid and 200 mg of Tween 40 were added to 1 mL of chloroform containing 0.5 mg of β -carotene. Then, the chloroform was removed using rotavapor at 40°C, and 100 mL of oxygen saturated distilled water were added to the remaining mixture. The resulting emulsion of β -carotene/linoleic acid was vigorously shaken. An aliquot of 2.5 mL of the fresh emulsion was blended with 350 µL of betalain (15.75 - 250 µg/mL) or ascorbic acid at (250 µg mg/mL), and incubated at 50°C in water bath. The discoloration kinetics of the emulsion with betalain, ascorbic acid or methanol

as negative control was monitored at 490 nm during 2 h at 15 min intervals. The antioxidant activity (AA) was calculated by the equation:

$$AA = 100 \cdot [1 - (AE_0 - AE_{120}) / (AC_0 - AC_{120})]$$

AE_0 and AE_{120} : Absorbance of samples at 0 and 120 min; AC_0 and AC_{120} : Absorbance of control at 0 and 120 min.

2.3. Anti-inflammatory activity

2.3.1. Evaluation of anti-arthritis effect "Inhibition of protein denaturation"

Evaluation of anti-arthritis effect of betalains was carried out as described by Erianti et al. (2015). A test solution containing 0.45 mL of 5% (W/V) Bovine Serum Albumine (BSA) and 0.05 mL of betalain at different concentrations (15.75, 31.25, 62.5, 125 and 250 µg/mL) was adjusted to pH 6.3, then incubated for 20 min at 37°C, and then heated 3 min at 57°C. After cooling, 2.5 mL of phosphate buffer (pH 6.3) were added to the mixture, and absorbance was measured at 416 nm. Diclofenac sodium at different concentrations (17.75, 31.25, 62.5, 125 and 250 µg/mL) was used as standard anti-inflammatory drug. The percentage of inhibition of protein denaturation was monitored using spectrophotometer at 416 nm and calculated according the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - [(Abs \text{ Test Solution} - Abs \text{ Product Solution}) / Abs \text{ Test Control}] \cdot 100$$

2.3.2. Inhibition of hemolytic effect on red blood cells "HRBC Method"

Betalain effect on HRBC hemolysis was performed using human blood (6 mL), collected contentedly from healthy volunteers without steroidal treatment during the last two weeks preceding the experiment, and centrifuged at 3000xg/5min. The cell pellet was washed with equal volume of normal saline (pH 7.4). The centrifugation/washing cycle was repeated several times until a clear supernatant was obtained. A 10% (V/V) human red blood cells suspension was prepared with normal saline and used immediately. A volume (1 mL) of betalain extract or diclofenac sodium as a standard at different concentrations (17.75, 31.25, 62.5, 125 and 250 µg/mL) was added to 2 mL of 0.25% (W/V) hypotonic solution and 0.5 mL of 10% erythrocyte suspension. The resulting mixtures were incubated at 56°C for 30 min, then cooled for 20 min and centrifuged 5 min at 3000 rpm. The absorbance of the recovered supernatant was measured at 560 nm.

The formula of Oyedapo and Famurewa (1995) was used to calculate the membrane stabilization:

$$\% \text{ Membrane stability} = 100 - \left[\frac{\text{Abs of test drug} - \text{Abs of drug control}}{\text{Abs of blood control}} \right]$$

2.4. Anticoagulant activity

The anticoagulant activity of betalain extract was run according to the method of Athukorala et al. (2007).

The blood samples contentedly collected from healthy donors without history of thrombosis or bleeding were mixed with 3.8% (W/V) sodium citrate in a volume ratio of 9:1 and centrifuged at 2400xg/20 min. The normal pooled plasma was stored at -60 °C until use. The Activated partial thromboplastin time (APTT) and the prothrombin time (PT) assays consisted of mixing 90µL of plasma with 10 µL of different concentrations of betalain extract (31.25, 62.5, 125 and 250 µg/mL) and heating at 37°C for 1 and 10 min, respectively. Then, 100 µL of APTT reagent were added to the first previous mixture and incubated at 37°C for 5 min. The APTT was saved after activation of coagulation by 100 µL of CaCl₂ (0.025M), considering the 0.9% NaCl solution and heparin as negative and positive controls. The PT assay was achieved after clotting induction using 200 µL of pre-incubated (37 °C for 10 min) PT reagent. The PT was recorded taking into account the same negative and positive controls.

2.5. Statistical analysis

Results were expressed as means ± SD of three determinations and statistical analysis was done using one-way ANOVA with student's t-test. Differences among means were considered as significant by Tukey's test at p <0.05.

3. Results and discussion

3.1. Betalain extraction

The extraction yield of betalains is low (0.04%) and the total betalain content in Algerian nopals was 48.13±2.2 mg/100g DW (Table 1). The presence of betalains in *Opuntia* spp cladodes was also reported by De Wit et al. (2019) who pointed out the dependence of the level of these pigments, which vary from 5.4 to 77.4mg/kg fresh weight (FW), and the cultivars. The predominance of betacyanins over indicaxanthins in betalain extract of the Algerian nopals found herein (table 1) was also observed by De Wit et al. (2019) for the South African clad-

	Betalains			DPPH (IC50) (µg/mL)
	Betacyanins	Betaxanthins		
Content (mg/100g DW)	25.64±1.42	22.49±0.78	Betalains	104.89
Yield (%)	Total 48.13±2.2		Ascorbic acid	102.22
	0.04%			

Table 1: Extraction yield of betalains from Algerian nopals and their DPPH scavenging expressed as IC50 compared to ascorbic acid. DW: dry weight. The content of betalains is the mean ±SD of three measurements.

odes. The yield of betalains extraction is proportional not only to the cultivars, but also to the technique used and its parameters (Sanchez-Gonzalez et al., 2013; De Wit et al., 2019). According to these researchers, the betacyanins/betaxanthins ratios in the *Opuntia* parts were related to the cultivars and will be expressed in their apparent colors.

3.2. Antioxidant activity

In the present work, antioxidant activity of betalain extract evaluated with DPPH scavenging ability revealed an IC50 (104.89 µg/mL) similar to that of ascorbic acid (102.99 µg/mL). This antiradical activity displayed a dose-dependent effect. Beside the dose-dependent effect of betalains toward the DPPH scavenging, the structure-activity relationship was also confirmed given that the intrinsic bioactivity of betalains basic structural unit or betalamic acid, could be enhanced by the connection with an aromatic ring and the presence of hydroxyl groups (Gandía-Herrero et al., 2010; Gandía-Herrero et al., 2016). In addition, betalamic acid shows a pKa of 6.8 linked to its nucleophilic capacity, and indicates the existence of relevant deprotonation equilibrium responsible of a pH- dependence of betalains antiradical activity (Gandía-Herrero et al., 2012).

Belhadj Slimen et al. (2017) reported a higher radical scavenging activity of different betalain extracts (EC50 ranging from 3.35 to 8.35 µM) than those of standards such as ascorbic acid (13.93 µM) and ferulic acid (19.35 µM). Besides, the free betalamic acid resulting from the breakup of betalains by oxidation may form de novo betalains by condensation with cyclo-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) or amino acids (Belhadj Slimen et al., 2017). The comparison of the radical scavenging effect of the two typical representatives of betaxanthins and betacyanins in *Opuntia*: indicaxanthin and betanin, has shown a better activity for betanin (Butera et al., 2002). The antioxidant activity of betaxanthins depends on the number of hydroxy and imino groups, whereas it is increased by acylation and

decreased by glycosylation for betacyanins (Belhadj Slimen et al., 2017).

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) of betalains is reported in figure 2A and display a higher but non-significant ($p < 0.05$) dose-dependent levels compared to that of ascorbic acid. The maximum registered FRAP level at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of betalains and ascorbic acid was about 0.901 ± 0.065 and 0.818 ± 0.02 , respectively. Zenteno-Ramírez et al. (2018) have reported a correlation coefficient of around 0.9111 between the high level of FRAP of prickly pear juice ($118790 \pm 16262 \mu\text{Meq.FeSO}_4/\text{g}$ dry weight) and its betalain content.

The betalain's strong reduction power is closely linked to their electron donation ability variable according to their chemical structures, and determined via the bond dissociation energy and the ionization potential of the molecule (Belhadj Slimen et al., 2017). Thus, betalamic acid can reduce two ions of Fe^{3+} to Fe^{2+} and therefore may donate two electrons to a free radical (Gandía-Herrero et al., 2012). Likewise, the weak reduction potential of betanin and indicaxanthin (0.4 and 0.6V, respectively) indicate their ease of electrons donation (Butera et al., 2002). Belhadj Slimen et al. (2017) correlated the high capacity of betalains in stabilization of free radicals to their interesting electrons donation. Even, they denote the advantage of betacyanins regarding betacaxanthins in term of reduction potential.

The inhibition of linoleic acid oxidation through the use of betalains avoids the discoloration of β -carotene, and seems very useful as a mimetic model of lipid peroxidation in biological membranes (Ferreira et al., 2006). The betalain extract inhibited significantly ($p < 0.05$) the β -carotene bleaching as a consequence of its anti-lipoxidation effect (fig.2B). This positive effect had a concentration-dependent kinetic (37.65, 55.28, 61.91 and 64.88%), and was not significantly ($p < 0.05$) higher than that of ascorbic acid (63.04% inhibition with 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ascorbic acid). Similar results were obtained by Reddy et al. (2005) who reported 71% lipid peroxidation inhibition with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Betalain. The ability of betalains to stop the oxidation of linoleic acid could be related to the potent free radical scavenging and reducing activities confirmed in the present study. In the same way, Belhadj Slimen et al. (2017) have suggested that the ability of betacyanins to inhibit the linoleic acid peroxidation and the oxidation of LDL is related to their antioxidant

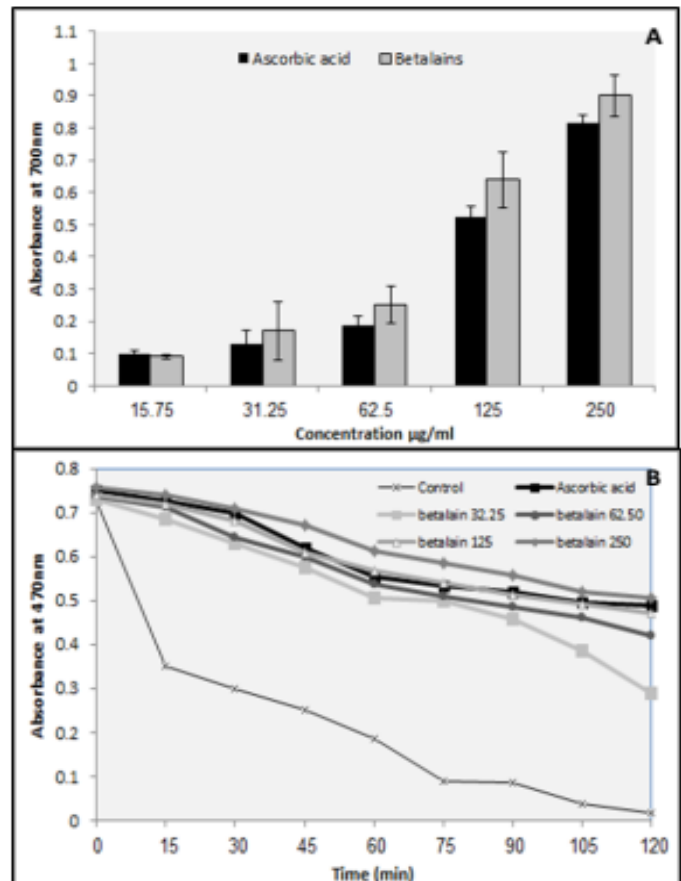


Figure 2: Antioxidant activity of betalains from Algerian nopals compared to ascorbic acid expressed as (A) Reducing power (FRAP) and (B) Kinetics of β -carotene bleaching (The results represent the mean \pm SD of three determinations).

and antiradical efficiencies.

Furthermore, the limitation of lipid peroxidation in this study was analogue to the findings of Tesoriere et al. (2003; 2004a; b) who suggested that small amounts of betalains, and despite their hydrophilicity, might bond to human low-density lipoproteins (LDL) and increased their resistance to oxidation injury in vitro and in vivo, proportionally to the incorporated quantities. Also, the low reduction potentials of some betalains allow them to reduce lipoperoxyl and alkoxy radicals, and become stable oxidized forms which are incapable to recapture electrons in order to be oxidants again. These pigments are considered as cationized molecules showing affinity for membrane moieties, where they may provide the oxygen-centered radicals scavenging function (Kanner et al., 2001, Butera et al., 2002). Even less in reducing potentiel, indicaxanthin exhibited a highest preservation trend in all models of lipid oxidation than betanin (Butera et al., 2002). Thus, it leads to predict an easier reaching of lipid interface by indicaxanthin due to a

higher lipophilicity, and present it according to Butera et al. (2002) as an advantageous compound in interactions with biological moieties.

3.3. Anti-inflammatory activity

The protein denaturing process implicates their conformational change coupled to the loss of the tridimensional structure and therefore of functions. It leads to the onset of inflammation pathways like arthritis through the formation of auto-antigens in vivo (Alam et al., 2015). Evaluation of anti-inflammatory property of betalains extract through the inhibition of BSA denaturation have shown a dose-dependent effect reaching a maximum of $95.51 \pm 2.16\%$ at a concentration of $250 \mu\text{g/mL}$ (fig.3A). Inhibition of BSA denaturation with the standard drug, diclofenac sodium, at a concentration of $250 \mu\text{g/mL}$ was slightly lower ($84.22 \pm 2.38\%$) and also dose-dependent. In a similar study, Winkler et al. (2005) observed that degradation of tryptophan and production of neopterin (a biomarker of cellular immunity) was inhibited with a rich-betalains extract in a dose-dependent way.

Moreover, the stopping of protein denaturation presents another functional mechanism of common non-steroidal anti-inflammatory drugs additionally to the inhibition of synthesis of prostaglandins (Sangeetha et al., 2011). We can qualify the nopals betalains, in conformity with their water-solubility and relevant antioxidant and antiradical activity, as stabilizers of BSA bonds and thus structure against thermic perturbation and oxidants. The inflammatory reaction and the redox status depend on each other and can be mutually involved (Gentile et al., 2004; Gandía Herrero et al., 2016).

Protective effect of betalains extracted from Algerian *Opuntia nopals* on HRBC membrane stabilization in comparison with the standard, diclofenac, is illustrated with the figure 3B. This effect was dose-dependent and the HRBC membrane stabilization rate reached a maximum of $66.79 \pm 1.09\%$ with 250 mg/mL betalains extract; while that of the standard does not exceed $48.97 \pm 2.73\%$ with 250 mg/mL diclofenac sodium. The difference between betalains and diclofenac effects becomes significant ($p < 0.05$) once the concentration reached $62.5 \mu\text{g/mL}$. Tesoriere et al. (2005) have linked betalains incorporation by HRBC and the resistance of erythrocytes to hemolysis. The immunosuppressive and anti-inflammatory activities of betalains were also confirmed by Gandía Herrero et al. (2016).

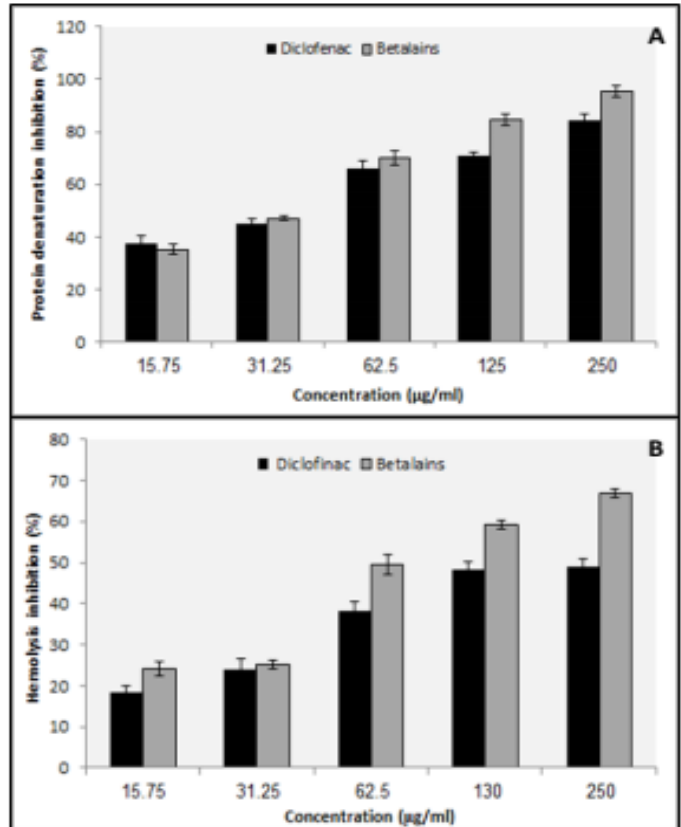


Figure 3: Anti-inflammatory effect of betalains from Algerian nopals and Diclofenac sodium against (A) Bovin serum albumin denaturation and (B) Human erythrocytes hemolysis (The results represent the mean \pm SD of three determinations).

The hemolytic effect of betalains recorded in the present experiment was also noted in many works cited in the study of Azeredo (2009), where their protective effect on red cells was related to the inhibition of lipid peroxidation and heme decomposition. To explain the anti-hemolytic reaction of betalains, two modes of intervention were suggested: i an internal mode involves an osmolytic function of incorporated betalains stabilizing the integrity of cells in a swelling state; in where the efflux of betalains, described as osmolytes by Sanjay et al. (2013), transports water with it and restore the normal cell volume; and ii an external mode involves the binding to cells membranes and uphold of their structure and functions, in example of the protein folding of transporters and so their carrier ability, beside the preservation of intactness of phospholipids acting even on the flexibility and resistance of membrane.

Regarding their structural sameness with lysosomes, the stabilization of human erythrocytes membranes against thermal hypotonic hemolysis, may indicate a limitation in the leakage of hydrolytic enzymes causing oxidative stress increase and

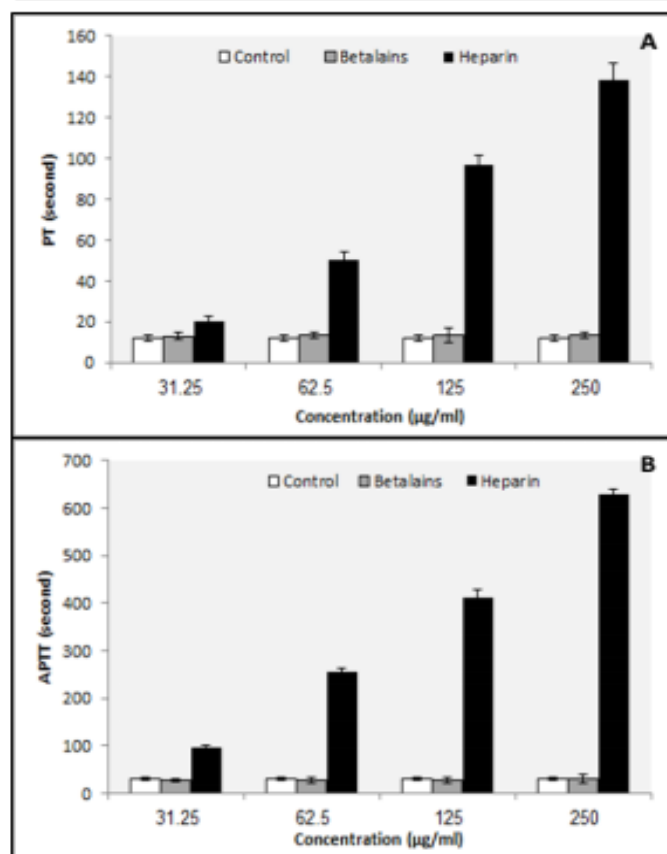


Figure 4: Anticoagulant activity of betalains from Algerian nopals and heparin on (A) Prothrombin time (PT) and (B) Activated partial thromboplastin time (APTT).

The results represent the mean \pm SD of three determinations.

tissues breakdown, and block thereafter this inflammatory pathway (Drăgan et al., 2016).

3.4. Anticoagulation activity

The prolongation of APTT and PT indicates a positive effect of tested molecules on the intrinsic and extrinsic pathways of coagulation, respectively (Ku and Bae, 2014). The result of the nopal's betalains effect on the Activated Partial Thromboplastin time (APTT) and the Prothrombin Time (PT) is reported at figure 4. There was non-significant prolongation of PT ($13.4 \pm 1.78s$) comparatively to the baseline coagulation time ($12.13 \pm 1.45s$). Heparin showed the highest PT in a significant way ($138.64s \pm 8.27$) (fig.4A). Meanwhile, betalains decreased the APTT to $27.3 \pm 3.114s$ as minimum instead of extending it in comparison with the control time ($30.1 \pm 3.88 s$). The heparin duplicated the APTT control to $627.98 \pm 13.21s$ in a concentration-dependent way (fig.4B). Heparin is a sulphated polysaccharide recognized to inhibit the thrombin formation by inactivating the activated factor X (Mohd Nor et al., 2019).

Overall, betalains in this study have no anticoagu-

lant activity. A slight interference of betalains with the protein integrity of extrinsic clotting factors (tissue factors), particularly with factor VII reported by Hall and Guyton (2011), could explain the weak modulation of the exogenous pathway and thereafter the Prothrombin Time (PT). The acceleration of Activated partial thromboplastin time (APTT) in betalains case could be clarified by a stimulation of endogenous factors (contact factors) or intensification of thrombin–fibrinogen reaction. The latter was recorded for several phyto-molecules (Omara et al., 2019). To be effective as anticoagulant, betalains should inhibit or decrease the production and the activity of coagulation factors such those recorded by Omara et al. (2019); tissue factors, thrombin, vitamin K-epoxide reductase and recently Factor X. According to these authors, the solubility and the presence of polysaccharides are fundamental to exhibit an anticlotting action. The lack of polysaccharides in the biochemical structure of betalains might be a reason of the absence of anticoagulant activity.

4. Conclusion

The present experiment highlighted the biological properties of betalains extracted from nopals of Algerian inermis *Opuntia ficus indica* which have exhibited a potent scavenging activity and reducing power as consequence of their electron donating. These properties ensured usefully the protection of lipids and proteins, as well as of erythrocytes against hemolysis. Such results suggest that the Algerian nopals could be considered as potential functional food with promising antioxidant and anti-inflammatory properties.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Algerian Ministry of Higher Education and Research (PRFU Project number DOOLO1UN270120190003).

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Alam MN, Biozid MS, Islam MR, Rahman MM, Chowdhury AI, Mazumdar, MMU (2015) In- vitro comparative study of anti-inflammatory and anti-arthritis effects of the methanol extract of *Cissus pentagona* Roxb and *Thunbergia grandiflora* Roxb leaf. The Pharma Innovation Journal 4(4): 39-42.
- Athukorala Y, Lee KW, Kim SK, Jeon YJ (2007) Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. Bioresource Technology 98: 1711–1716

- Azeredo HMC (2009) Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science and Technology* 44 (12): 2365–2376
- Belhadj Slimen I, Najar T, Abderrabba M (2017) Chemical and Antioxidant Properties of Betalains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(4): 675-689
- Betancourt C, Cejudo-Bastante MJ, Heredia FJ, Hurtado N (2017) Pigment composition and antioxidant capacity of betacyanins and betaxanthins fractions of *Opuntia dillenii* (Ker Gawl) Haw cactus fruit. *Food Research International* 101: 173-179
- Blios MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.
- Butera D, Tesoriere L, Di Gaudio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi AM, Kohen R, Livrea MA (2002) Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(23): 6895-6901.
- Cabanes J, Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F, Jimenez-Atiñzar M (2019) One-Step Synthesis of Betalains Using a Novel Betalamic Acid Derivatized Support. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(17): 3776-3782
- Castellanos-Santiago E, Elhadi MY (2008) Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(14): 5758-5764
- De Wit M, Du Toit A, Osthof G, Hugo A (2019) Cactus pear antioxidants: a comparison between fruit pulp, fruit peel, fruit seeds and cladodes of eight different cactus pear cultivars (*Opuntia ficus-indica* and *Opuntia robusta*). *Journal of Food Measurement and Characterization* 13: 2347–2356
- Drăgan M, Stan CD, Pânzariu A, Profire L (2016) Evaluation of anti-inflammatory potential of some new ferullic acid derivatives. *Farancia* 64(2): 194-197
- Erianti F, Nadhila AR, Adiba, Suhartono E (2015) Screening of Tropical Fruits for Antiinflammation Activity in Vitro in South Kalimantan Indonesia. *Journal of Medical and Bioengineering* 4(5): 407-411.
- Ferreira A, Proença C, Serralheiro M L M, Araujo M E M (2006) The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108(1): 31-37.
- Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F (2010) Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* 232(2):449–460.
- Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F (2012) Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *Journal of Natural Products* 75(6): 1030–1036.
- Gandía-Herrero F, García-Carmona F (2013) Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science* 18 (16): 334–343.
- Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F (2016) Biological activities of plant pigments betalains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(6): 937-945.
- Gentile C, Tesoriere L, Allegra M, Livrea MA, D'Alessio P (2004) Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Signal Transduction and Communication in Cancer Cells* 1028: 481–486.
- Ginestra G, Parker MI, Bennett RN, Robertson J, Mandalari G, Narbad A, Lo curto RB, Bisignano G, Faulds CB, Waldron KW (2009). Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:10323–10330.
- Hall JE, Guyton AC (2011) *Textbook of Medical Physiology*, Elsevier Health Sciences, Amsterdam, Netherlands, 12th edition.
- Hernández-Urbiola M, Pérez-Torrero E, Rodríguez-García M (2011). Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus indica*) at varied ages in an organic harvest. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8:1287–1295.
- Heuzé V, Tran G (2017). Prickly pear (*Opuntia ficus-indica*). *Feedipedia*, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO.
- Kanner K, Harel S, Granit R (2001) Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5178–5185.
- Kartal N, Sokmen M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A (2007) Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry* 100: 584–589.
- Ku SK, Bae JS (2014). Antiplatelet and antithrombotic activities of purpurogallin in vitro and in vivo. *Biochemistry Molecular Biology* 47(4): 376-381
- Mohd Nor NH, Othman F, Mohd Tohit ER, Noor SMD, Razali R, Hassali HA, Hassan H (2019) In Vitro Antiatherothrombotic Effects of Extracts from *Berberis Vulgaris* L., *Teucrium Polium* L., and *Orthosiphon Stamineus* Benth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 324:1-10
- Omara G, Abdallah L, Barakatb A, Othman R, Bourinee H (2019). In vitro haemostatic efficacy of aqueous, methanol and ethanol plant extracts of three medicinal plant species in Palestine. *Brazilian Journal of Biology* Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Journal of Nutrition* 44: 307–315.
- Oyedapo OO, Famurewa AJ (1995) Antiprotease and membrane stabilizing activities of extracts of *Fagara zanthoxylloides*, *Oxalysubscorpioides* and *Tetrapleura tetraptera*. *International Journal of Pharmacognosy* 33: 65 -69.
- Reddy MK, Alexander-Lindo RL, Nair MG (2005) Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(23): 9268-9273
- Sanchez-Gonzalez N, Jaime-Fonseca MR, San Martin-Martinez E, Zepeda LG (2013) Extraction, stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(49): 11995–12004
- Sangeetha M, Kousalya K, Lavanya R, Cherukuru S, Chamundeeswari D, Uma Maheswara R (2011) In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritis Activity of Leaves of *Cleodendron Inerme*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 2 (1): 822-827.
- Sanjay PC, Sheth NR, Rathod ISB, Suhagia N, Maradia RB (2013) Analysis of betalains from fruits of *Opuntia* species. *Phytochemistry Reviews* 12:35-45

Slimen IB, Najar T, Abderrabba M (2017) Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(4): 675–689

Stintzing FC, Carle R (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition and Food Research* 49(2): 175–194.

Stintzing FC, Schieber A, Carle RC (2003) Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *European Food Research and Technology* 216:303-311.

Suryawanshi P, Vidyasagar GM (2016). Phytochemical screening for secondary metabolites of *Opuntia dillenii* Haw. *Journal of Medicinal Plants Studies* 4(5): 39-43.

Tesoriere L, Butera D, D'Arpa D et al. (2003) Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radical Research* 37(6): 689–696.

Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Livrea MA (2004a) Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: Potential health effects of betalains in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 80(4): 941–945

Tesoriere L, Butera D, Pintaudi AM, Allegra M, Livrea MA (2004b) Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *American Journal of Clinical Nutrition* 80(2): 391–395

Tesoriere L, Butera D, Allegra M, Fazzari M, Livrea MA (2005) Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4):1266-1270.

Winkler C, Wirleitner B, Schroecksnadel K, Schennach H, Fuchs D (2005) In vitro effects of beet root juice on stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 1(4):180-185.

Zenteno-Ramírez G, Juárez-Flores Bi, Aguirre-Rivera Jr, Monreal-Montes M, Mérida García J, Pérez Serratos M, Varo Santos Ma, Ortiz Pérez Md, Rendón-Huerta JA (2018) Juices of prickly pear fruits (*Opuntia* spp.) as functional foods. *Italian Journal of Food Science* 30(3):614-627



South Asian Journal of Experimental Biology



ABOUT THE JOURNAL: SAJEB (eISSN: 2230-9799) is a peer-reviewed, open-access and online journal aimed at advancement and rapid dissemination of scientific knowledge generated by the highly motivated researchers in the field of biological sciences through publication of high-quality original research and critical up-to-date review articles covering all the aspects of biological sciences. Every year, it publishes six issues. SAJEB has received Global Impact Factor (GIF)-2015, 0.765; Index Copernicus Value-2015, 93.0 and NAAS (ICAR)-India 2017 rating, 4.79. SAJEB has been included in the ISI master list of journals of Thomson Reuters under Zoological Record. The SAJEB is also covered by CABI (UK), AGRICOLA, NLM catalogue, CAS (ACS, USA), DOAJ, Journal TOCs (ICBL, Edinburgh), Directory of research Journals Indexing (DRJI) and Indian Science Abstracts (ISA, NISCAIR). SAJEB is a member of CrossRef.