

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -
Université Mohammed Saddik Benyahia-Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Microbiologie Appliquée et
Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم
التغذية

M. C. Q. 01116

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie

Option : Contrôle de qualité des produits Alimentaires

Thème

01/01



**La bioconservation des poissons par l'ajout d'extraits du
fruit d'*Arbutus unedo* L: Evaluation de la qualité au cours
du stockage réfrigéré**

Membres de Jury :

Président: M^{elle} BOURAD D.

Examineur: M^{elle} AKKOUCHE Z.

Encadreur: Dr. IDOUI T.

Réalisé par :

M^{elle} OUALI Chahinez

M^{elle} MERIBAI Khadidja

M^{elle} Bourad D. [Signature]

Année Universitaire 2015-2016

Numéro d'ordre (bibliothèque) :.....



Remerciements

Nous remercions notre créateur Allah, le tout Puissant pour le courage et la volonté qu'il nous a donnés pour mener ce travail à terme.

*On commence par exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à notre encadreur **Dr. IDOUY Tayeb** qui nous a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité. Nous étions satisfaites de votre qualité exceptionnelle de bon enseignant.*

On remercie également les membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci à Melle « Bouhenna Imene » pour les aides et les informations qu'elle nous a fourni.

Chahinez + Khadija



Dédicaces



Je dédie ce modeste travail

*À la lumière de mes yeux, mes très chers parents :
Qui m'ont offert une enfance très heureuse, Qui m'apportent
soutien et amour chaque jour, Qu'ils trouve ici le témoignage de
ma reconnaissance et mon amour.*

*À mon très cher frère :
Fares et sa femme Amel
À ma très chère Sœur :
Ilham Meriem et son mari Farid*

Que Allah me les garde et les protège.

À tous mes enseignants particulièrement monsieur IDOUI.

À tous mes amis de promotion.

*À mon binôme : Khadidja
À tous ceux qui m'aiment...
À tous ceux que j'aime...*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur,
de santé et de réussite.*



CHAHINEZ





Dédicaces



Je dédie ce modeste travail

*À la lumière de mes yeux, mes très chers parents :
Qui m'ont offert une enfance très heureuse, Qui m'apportent
soutien et amour chaque jour, Qu'ils trouve ici le témoignage de
ma reconnaissance et mon amour.*

*À mes très chers frères :
Tarek et Yasser
À mes très chères Sœurs :
Dounia, Fatiha et Meriem*

Que allah me les garde et les protège.

À tous mes enseignants particulièrement monsieur IDOUI.

À tous mes amis de promotion.

*À mon binome : Chahinez
À tous ceux qui m'aiment...
À tous ceux que j'aime...*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur,
de santé et de réussite.*

Khadija



Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction Générale.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur l'*Arbutus unedo* L.

I.1. Origine et historique.....	2
I.2. Les fruits sauvages et Etymologie d' <i>Arbutus unedo</i> Linné.....	2
I.3. Position systématique.....	3
I.5. Description botanique de l' <i>Arbutus unedo</i> L.....	3
I.5.1. Arbre.....	3
I.5.2. Feuilles.....	4
I.5.3. Fleurs, fruits et grains.....	4
I.6. Utilisations alimentaire de fruit d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	5
I.6.1. Utilisation comme miel.....	5
I.6.2. Utilisation comme boissons.....	6
I.6.3. Utilisation culinaire.....	6

Chapitre II : Les antioxydants du fruit d'*Arbutus unedo* L.

II.1. Définition des antioxydants	7
II.2. Antioxydants du fruit d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	7
II.2.1. Les Flavonoïdes.....	9
II.2.1.1. Activité antioxydante des flavonoïdes.....	9
a. Piégeage direct de radicaux libres.....	10
b. Chélation des ions métalliques.....	10
c. Inhibition enzymatique.....	10
II.2.2. Les caroténoïdes.....	10
II.2.2.1. Activité antioxydante des caroténoïdes.....	11
II.2.3. Les tannins.....	11
II.2.3.1. Activité anti-oxydante des tannins.....	11
II.3. L'utilisation des extraits d'antioxydants dans la bio-conservation des poissons.....	12

Sommaire

Etude expérimentale

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel.....	13
II.1.1. Matériel végétal.....	13
II.1.2. La sardine commune (<i>Sardina pilchardus</i>).....	13
II.1.3. Les souches indicatrices.....	14
II.1.4. Les milieux de culture.....	14
II.1.5. Les produits chimiques et réactifs.....	14
II.1.6. Appareillage.....	15
II.2. Méthodes.....	15
II.2.1. Détermination des paramètres morphologiques du fruit d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	15
II.2.2. Détermination du pH.....	16
II.2.3. Extraction des antioxydants contenus dans le fruit d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	16
II.2.3.1. Extraction des flavonoïdes.....	16
II.2.3.2. Extraction des caroténoïdes.....	16
II.2.3.3. Extraction des tannins	16
II.2.4. Dosage des antioxydants extrait.....	17
II.2.4.1. Flavonoïdes.....	17
II.2.4.2. Caroténoïdes totaux.....	17
II.2.4.3. Tannins.....	18
a. Tanins totaux.....	18
b. Tanins condensé.....	18
c. Tanins hydrolysable.....	18
II.2.5. Analyse qualitative par HPLC.....	19
II.2.6. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de fruit.....	19
II.2.6.1. Activité antioxydante totale (TAC).....	19
II.2.6.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	19
II.2.6.3. Test du blanchissement du β -carotène.....	20
II.2.6.4. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 scavenging activity).....	20
II.2.7. Activité antimicrobienne des trois extraits du fruit d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	21
II.2.7.1. Préparation des dilutions des extraits.....	21

Sommaire

II.2.7.2. Préparation des inoculums.....	21
II.2.7.3. Test de l'activité antimicrobienne.....	21
II.2.8. Utilisation des extraits dans le processus de la conservation.....	22
II.2.8.1. Préparation des extraits et des échantillons.....	22
II.2.8.2. Essai de conservation de la sardine (<i>Sardina pilchardus</i>) par les différents extraits.....	22
II.2.8.3. Contrôle de la qualité de la sardine.....	22
II.2.8.3.1. Contrôle microbiologique de la sardine.....	22
II.2.8.3.2. Détermination du pH de la sardine.....	23
II.2.8.3.3. Contrôle des échantillons pendant la conservation.....	23
II.3. Analyse statistique des résultats	24

III. Résultats et discussion

III.1. Etude de caractéristiques morphologiques du fruit d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	25
III.2. Détermination du pH	25
III.3. Détermination de la teneur en antioxydant	26
III.3.1. Rendement d'extraction	26
III.3.2. Dosage des antioxydants.....	27
III.3.2.1. Teneur en flavonoïdes totaux.....	27
III.3.2.2. Teneur en caroténoïdes.....	28
III.3.2.3. Teneur des tannins totaux, condensés et hydrolysables.....	29
III.4. Analyse des extraits par HPLC.....	30
III.5. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de fruit.....	32
III.5.1. Activité antioxydante totale (TAC).....	32
III.5.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power).....	33
III.5.3. Test du blanchissement du β -carotène.....	34
III.5.4. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 scavenging activity).....	35
III.6. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits.....	36
III.6.1. Activité antibactérienne.....	37
III.6.2. Activité antifongique.....	39
III.7. Essai de conservation de la sardine (<i>Sardina pilchardus</i>) par les différents extraits.....	40
III.7.1. Analyses microbiologiques de la sardine (matière première).....	40
III.7.2. Détermination du pH.....	42
III.7.3. Contrôle des échantillons de la sardine pendant la conservation.....	42

Sommaire

III.7.3.1. Détermination du pH.....	42
III.7.3.2. Evaluation de l'évolution du contaminant <i>S. aureus</i>	43
Conclusion.....	45
Références Bibliographiques	
Annexes	

Liste Des Abréviations

A.: *Acinetobacter*

A.: *Aspergillus*

CT : Coliformes Totaux

CTT : Coliformes Thermotolérants

E.: *Escherichia*

HPLC: High performance liquid chromatography

K.: *Klebsiella*

L.: *Listeria*

O₂• : Anion superoxyde.

¹O₂ : Oxygène singulet

OGA : Gélose glucose à l'oxytétracyclique

OH• : Radical hydroxyl.

P : Probabilité

P.: *Pseudomonas*

ROO' : Radicaux peroxydes

S. : *Staphylococcus*

sp. : Espèce non précisée

Liste Des Tableaux

Tableau 01 : Classification taxonomique d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	03
Tableau 02 : Composition en antioxydants du fruit d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	08
Tableau 03 : Paramètres morphologiques d' <i>Arbutus unedo</i> L. aux trois stades de maturation.....	25
Tableau 04 : pH des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation.....	26
Tableau 05 : Activité antibactérienne des différents extraits.....	37
Tableau 06 : Activité antifongique des différents extraits.....	39

Liste Des Figures

Figure 01: Répartition mondiale de l' <i>Arbutus unedo</i> L.....	02
Figure 02: Arbousier.....	04
Figure 03: Fruits, fleurs et feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	05
Figure 04: Structure de base des Flavonoïdes.....	09
Figure 05: Fruit congelé d' <i>Arbutus unedo</i> L. en trois stades de maturation.....	13
Figure 06: L'échantillon de la sardine commune (<i>Sardina pilchardus</i>).....	13
Figure 08: Rendement d'extraction de composés phénoliques de fruit d' <i>Arbutus unedo</i> .L.....	27
Figure 09: Teneur de l'extrait en Flavonoïdes.....	28
Figure 10: Teneur en caroténoïdes.....	29
Figure 11: Teneur en tannins totaux, condensés et hydrolysables du fruit vert d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	29
Figure 12: Chromatogramme de l'extrait flavonoïdique du fruit rouge analysé par l'HPLC.....	30
Figure 13: Chromatogramme de l'extrait tannique du fruit vert analysé par l'HPLC.....	31
Figure 14: Chromatogramme de l'extrait caroténoïque du fruit rouge analysé par l'HPLC.....	31
Figure 15: Capacité antioxydante totale des trois extraits méthanoliques du fruit d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	32
Figure 16: Pouvoir réducteur des extraits du fruit étudié.	33
Figure 17: Activité antioxydante relative des trois extraits méthanoliques du fruit d'arbousier.....	35
Figure 18: Pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène des extraits de fruit et de l'acide ascorbique aux différentes concentrations.....	36
Figure 19: Activité antibactérienne des extraits testés : cas de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Figure 20: Activité antibactérienne des extraits testés : cas d' <i>Escherichia coli</i>	38
Figure 21 : Activité antibactérienne des extraits testés : cas de <i>Salmonella sp</i>	38
Figure 22 : Activité antibactérienne des extraits testés : cas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Figure 23 : Activité antibactérienne des extraits testés : cas de <i>Listeria monocytogenes</i>	38
Figure 24 : Activité antibactérienne des extraits testés : cas de <i>Klebsiella oxytoca</i>	38
Figure 25 : Activité antibactérienne des extraits testés : cas d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	38
Figure 26 : Activité antifongique des extraits testés : cas de <i>Fusarium</i>	40
Figure 27 : Activité antifongique des extraits testés : cas de <i>Penicillium</i>	40
Figure 28 : Colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman.....	41
Figure 29 : Recherche des Salmonelles sur milieu Hecktoen	41

Figure 30 : Variation du pH des filets de sardine au cours de la conservation.....42

Figure 31 : Evolution du nombre de *S. aureus* inoculé sur la sardine pendant la conservation43

Introduction générale



Certaines plantes se rencontrent à l'état spontané et s'adaptent aux multiples sols et climats notamment les fruits comme l'arbose (*Arbutus unedo* L.) (Dib, 2008). En effet, *Arbutus unedo* L. est un fruit sauvage qui se développe dans les régions méditerranéennes et connu en Algérie sous le nom vulgaire de « Lendj » (IUCN, 2005). Ce fruit a été utilisé dans la médecine traditionnelle, car il possède des propriétés astringentes, diurétiques et antiseptiques (Özcan , Haciseferoğulları, 2007). Il est également utilisé pour traiter les pathologies cardio-vasculaires, le diabète et les pathologies inflammatoires (El Hoaouari et al., 2007).

Les fruits d'arbousier renferment également plusieurs composés antioxydants importants, y compris des vitamines, aussi bien que différents composés phénoliques, ce qui leur confère une activité antioxydante très importante, de plus, ces fruits ont également montré une activité antimicrobienne (Pallauf et al., 2008 ; Fortalezas et al., 2010).

Le poisson et ses produits dérivés jouent un rôle considérable dans notre alimentation. C'est une denrée alimentaire de haute valeur nutritive mais très périssable. Les reproches les plus souvent formulés à leur égard concernent un éventuel manque de fraîcheur et de qualité. En effet, ces produits de la pêche sont aussi connus par leur grande susceptibilité à la dégradation enzymatique, microbiologique et organoleptique liée à la structure protéique et lipidique du muscle (Jeantet et al., 2006).

Afin de limiter les diverses altérations du poisson et vue la demande accrue du consommateur pour des produits «naturels», l'incorporation de substances bioactives a été envisagée par les industriels. Au sein de ces substances bioactives, les polyphénols en constituent un vaste sujet de recherches qui intéressent les industries agroalimentaires (IAA) par leur implication sur la flaveur des aliments et leur incidence sur la conservation des produits (Sarni-Manchado, Cheynier, 2006).

Notre recherche sera, donc, focalisée sur les composés phénoliques de l'arbose «*Arbutus unedo* L.» et leur activité antioxydante. Une étude comparative sur les propriétés antibactérienne des différents extraits phénoliques obtenus sera rapportée afin de choisir les composés les plus efficaces et de tenter d'analyser leur rôle éventuel dans les processus de conservation de la sardine commune. Il s'agira, dans un premier temps, d'une proposition d'une synthèse bibliographique visant à apporter des connaissances générales sur l'arbousier «*Arbutus unedo* L.» et les antioxydants.

L'ensemble des matériel et méthodes utilisés dans cette étude sera ensuite décrit. Puis les principaux résultats seront présentés et discutés. Enfin une conclusion générale synthétisant le travail.

*Synthèse
bibliographique*



Chapitre I
Généralités sur l'Arbouse
(Arbutus unedo L.)



I.1. Origine et historique d'*Arbutus unedo* L

Arbutus unedo L., est un arbuste à feuilles persistantes, originaire de la région méditerranéenne, on peut le trouver jusqu'à 600 m d'altitude voir 1200 m en Europe occidentale, centrale et méridionale, l'Afrique Nord-Est (à l'exclusion de l'Égypte et de la Libye) et les îles Canaries et l'Asie occidentale, où le froid n'est pas très habituel et la sécheresse d'Été n'est pas très intense (Figure 01) (Kim, 2012 ; Tonelli et Gallouin, 2013).

En Europe, elle se développe la plupart du temps dans le bassin méditerranéen (Portugal, Espagne, France, Italie, Albanie, la Grèce, la Bosnie et l'Herzégovine, Croatie, Macedonia, Monténégro, la Serbie et la Slovénie) y compris quelques îles méditerranéennes (Baléare, la Corse, la Sardaigne, la Sicile et la Crète), principalement, il peut également s'adapter à la côte du Sud- Ouest de l'Irlande (Torres et al., 2002). L'arbousier en Algérie, et bien représenté dans le tell Algérien, surtout dans les forêts de chêne liège (des régions de Jijel, Skikda, et El Taraf) (Aksil, 2015).

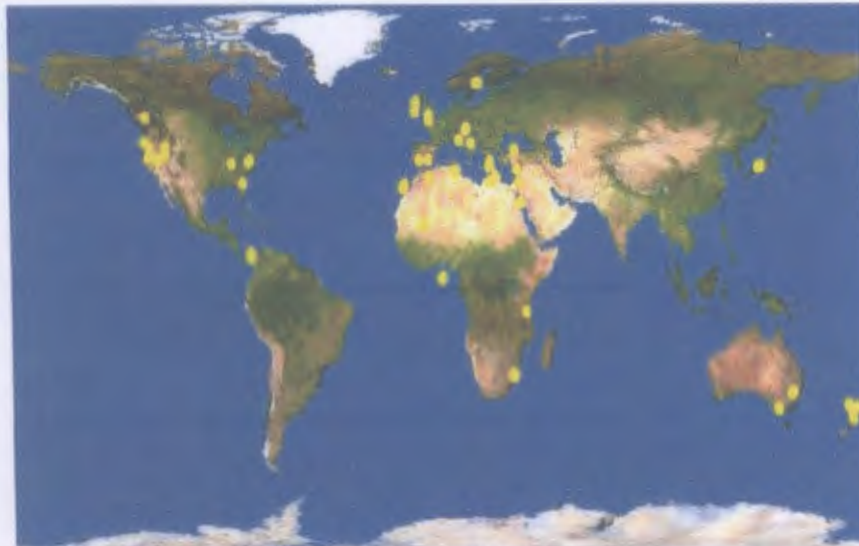


Figure 01. Répartition mondiale de l'*Arbutus unedo* L. (●) (Boweri et Siphoninus, 2000).

I.2. Les fruits sauvages et Etymologie d'*Arbutus unedo* Linné

Les fruits sauvages comestibles contribuent de manière significative au régime des régions méditerranéennes rurales; ils sont consommés tout au long de l'année sous formes fraîches ou traités (Leonti et al., 2006). Leurs rôles nutritionnel et sanitaire ont été rapportés en beaucoup d'études alimentaire et ethnobotanique dans le monde entier. Les fruits contiennent souvent des teneurs plus élevés en nutriments et des composés bioactifs que beaucoup d'autres espèces cultivées (Trichopoulou et al., 2000 ; Tardio et al., 2006).

Arbutus est le nom latin de l'arbousier, il peut être le diminutif d'*arbor*, l'arbre, mais aussi provenir du terme celte « arbois », fruit raboteux, qui rendrait compte du toucher de l'arboise. Son nom d'espèce *unedo* est dérivé de « unum edo » (Tonelli et Gallouin, 2013).

Ce fruit est connu sous plusieurs noms vernaculaires, Assisnou en Berbère, Strawberry tree en anglais et Lendj en arabe. Il se trouve dans les pays Européens méridionaux : ervedeiro, medronheiro en Portugal, albocera, alborocera, borrachin, madroñera, madroño en l'Espagne, corbezzolo, peloso de sorbo en Italie et Koumaria en Grèce (Kim, 2012).

I.3. Position systématique d'*Arbutus unedo* Linné

Selon les classifications botaniques, la position taxonomique de l'*Arbutus unedo* L. est représentée dans le tableau 01.

Tableau 01. Classification taxonomique de l'*Arbutus unedo* L. (Mendes, 2010)

Rang taxonomique	Signification
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermaphytes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnolopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Ericales
Sous-ordre	Ericanae
Famille	Ericaceae
Sous-famille	Arbutoideae
Genre	<i>Arbutus</i>
Espèce	<i>Arbutus unedo</i> Linné.

I.4. Description botanique de l'*Arbutus unedo* L.

I.4.1. Arbre

L'arbousier, ou arbres aux fraises, petit ligneux méridional, n'est en fait qu'un arbuste, voire un arbrisseau. Il est très décoratif par son écorce, son port, son feuillage persistant, sa floraison, et sa fructification (Didi, 2009).

Après la fécondation, l'ovaire se transforme en un fruit charnu indéhiscent, une baie sphérique, légèrement aplatie aux pôles et qui mesure 2 à 3 cm de diamètre à maturité, il possède de petit nombreux pépins et sa peau (épicarpe) se hérissé de petits tubercules pyramidaux siliceux (Tonelli et Gallouin, 2013).

Le fruit, l'arbose, varie considérablement dans la taille, bien qu'il fasse la moyenne de 1 à 2 cm de diamètre. C'est une jolie baie sphérique rouge, vu en distance, il ressemble aux fraises mais cette ressemblance ne s'applique pas au goût. Parfois orangée, elle est toujours hérissée de courts tubercules pyramidaux et renferme de nombreuses graines (Figure 03) (Boullard, 1997; 2001 ; Iserin, 2001).

Les fruits prennent environ 12 mois pour mûrir ; donc, l'arbre porte fruits et fleurs mûrs en même temps. Le processus de fleuraison et de fructification s'étend d'octobre à février (Takrouni et al., 2012).

A l'intérieur du fruit, les cinq loges contiennent de nombreuses petites graines jaunâtres (les pépins) riches en lipides (Tonelli et Gallouin, 2013).



Figure 03. Fruits, fleurs et feuilles d'*Arbutus unedo* L. (Reille, 2015).

I.5. Utilisations alimentaires de fruit d'*Arbutus unedo* L.

I.5.1. Utilisation comme miel

Le miel d'arbousier est un produit connu des régions méditerranéennes qui se caractérise par son « gout amer », il est riche en acides aminés libres; l'acide glutamique, l'arginine, l'alanine et de la phénylalanine dont la proline est le plus abondant (Spano et al., 2006). En outre, il se caractérise

Chapitre II

LES ANTIOXYDANTS

D'Arbutus unedo L.



p-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique (Ayaz et al., 2000). D'une manière générale, la composition en composés antioxydant du fruit d'*Arbutus unedo* L. est présenté dans le tableau 02.

Tableau 02. Composition en antioxydant du fruit d'*Arbutus unedo* L. (Pallauf et al., 2008).

Composés	Teneur (mg) pour 100 g de portion comestible
Anthocyanines	3.77±0.856
Delphinidine-3-galactoside	0.38 ± 0.112
Cyanidine-3-galactoside	2.84 ± 0.935
Cyanidine-3-glucoside	0.12 ± 0.025
Cyanidine-3-arabinoside	0.41 ± 0.133
Dérivés d'acide ellagique	1.54 ± 0.162
Acide ellagique diglucoside	0.22±0.062
Acide ellagique glucoside	0.46 ± 0.019
Acide methylellagique rhamnoside+acide ellagique arabinoside	0.24 ± 0.04
Acide ellagique xyloside	0.29±0.454
Flavonols	1.14 ± 0.346
Myricetine-3-xyloside	0.17±0.012
Quercetine-3-rutinoside	0.15 ± 0.001
Quercetine-3-xyloside	0.52 ±0.031
Quercetine-3-rhamnoside	0.29 ± 0.454
Proanthocyanidines	27.46 ± 0.989
Gallocatechine	3.64±0.795
Gallocatechine-4.8-catechine	1.87±0.254
Catechine	4.16±0.854
Epicatechine	2.89±0.237
Ec-Ec-C	0.41 ± 0.052
Ec-Ec-Ec	4.52± 0.874
Autres	
Vitamin C, total	6.03±0.15
Vitamin E (α-tocopherol)	0.023 ± 0.001
Carotenoids (total)	0.064 ± 0.014
β-carotène	0.025±0.007
Lutein+ zeaxanthine	0.042 ± 0.009
β -cryptoxanthine	Traces

Avec, Ec = Epicatechine ; C = Catéchine

aux fruits et légumes leurs couleurs orange, rouge et jaune. La plupart des caroténoïdes ont une propriété antioxydante dont leur fonction essentielle est de protéger les plantes (Causse, 2005). Comme ils le font pour les plantes, ils ont des effets bénéfiques sur notre santé, ils sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires particulièrement vis-à-vis de la lipoperoxydation des phospholipides membranaires grâce à leurs structures (Packer et al., 1981 ; Rodriguez-Amaya et Kimura, 2004).

II.2.2.1. Activité antioxydante des caroténoïdes

Les études sur les potentialités antioxydantes des caroténoïdes ont commencé il y a une trentaine d'années. Elles ont montré (*in vitro* et *in vivo*) que le bêta-carotène et certains autres caroténoïdes, et notamment le lycopène, l'alpha-carotène, la lutéine, exercent des fonctions antioxydantes dans des conditions particulières de basse pression partielle d'oxygène. Les caroténoïdes sont capables de prévenir et d'interrompre les procédés de peroxydation en neutralisant l'oxygène singulet et les radicaux libres (Urban et al., 1995).

II.2.3. Les tannins

Les tannins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant (Roux et Catier, 2007).

Les tannins sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales.

Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. On distingue, les tannins hydrolysables et les tannins condensés. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tannins sont le vin et le thé (Pénicaud, 2009).

II.2.3.1. Activité anti-oxydante des tannins

De nombreux tannins présentent des propriétés anti-oxydantes par le piégeage des radicaux libres ou encore par l'inactivation des ions pro-oxydants (Hässig et al., 1999; Lim et al., 2007).

Grâce à leurs fonctions phénoliques, qui ont un fort caractère nucléophile, les tannins sont d'excellents piègeurs de radicaux libres comme tous les polyphénols (propriétés antioxydantes). En effet, ils vont inhiber la formation d'ions peroxyde et surtout la peroxydation des lipides et ils vont

*ETUDE
EXPERIMENTALE*



II- Matériel et méthodes



II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

Les fruits d'*Arbutus unedo* L. de différents stades de maturation (vert, jaune et rouge) (Figure 05) ont été récoltés de la région de « Texenna », wilaya de Jijel, durant la période allant de 20 novembre 2015 à 08 janvier 2016 puis conservés par congélation.



Figure 05. Fruits congelés d'*Arbutus unedo* L. en trois stades de maturation.

II.1.2. La sardine commune (*Sardina pilchardus*)

Afin de valider l'effet antibactérien de nos extraits, la sardine commune (*Sardina pilchardus*) a été utilisée. Le choix de la sardine comme matrice alimentaire repose sur le fait que ce poisson est le plus communément consommé, et très vulnérable aux altérations microbienne et au processus d'oxydation lipidique.

La sardine est fraîchement achetée le 16 Mai 2016 du marché local de Jijel. Elle est acheminée au laboratoire dans une enceinte isothermique de type glacière (figure 06).



Figure 06. L'échantillon de la sardine commune (*Sardina pilchardus*).

II.1.3. Les souches indicatrices

Pour la détermination de l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques du fruit d'*Arbutus unedo* L., des souches bactériennes et fongiques ont été utilisées:

☞ sept souches bactériennes qui sont :

- Listeria monocytogenes* ATCC 25922;
- Klebsiella oxytoca* ATCC 25922;
- Escherichia coli* ATCC 25922;
- Staphylococcus aureus* ATCC25923;
- Salmonella* sp;
- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;
- Acinetobacter baumannii* ATCC19606.

☞ Et quatre souches fongiques à savoir :

- *Fusarium*;
- *Penicillium*;
- *Aspergillus niger* ;
- *Aspergillus flavus*.

II.1.4. Les milieux de culture : Au cours de cette étude, nous avons utilisé ce qui suit:

- ☞ **Les géloses :** gélose Mueller-Hinton, gélose nutritive, gélose Baird Parker, gélose au désoxycolate 0.1%, gélose OGA, gélose Hecktoen.
- ☞ **Les bouillons :** bouillon nutritif, eau peptonée alcaline, Giolittii contonii.

II.1.5. Les produits chimiques et réactifs : Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants:

- ☞ **Les acides et bases :** Acide sulfurique (H_2SO_4) (20%, 0.6M), hydroxyde de sodium (NaOH) (1M), acide chlorhydrique concentré (HCl), acide trichloracétique (TCA) (10%), acide linoléique.
- ☞ **Les réactifs et tampons :** Folin-Ciocalteu, Iodate de potassium KIO_3 (2.5%), tampon phosphate de sodium (0,2M à pH 6,6 ; 1M à pH 7.4), Tween 80.
- ☞ **Les antioxydants et radicaux libres standard :** Quercétine, acide gallique, vanilline, catéchine, acide tannique, acide ascorbique, β -carotène, butyl-hydroxytoluène (BHT).
- ☞ **Alcool et autres produits chimiques :** Ether de pétrole, éthanol (70 %), chloroforme, acétate d'éthyle, nitrite de sodium ($NaNO_2$) (5%), trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (10%), éther diéthylique, méthanol (concentré, 80%); carbonate de sodium Na_2CO_3 (7.5%),

acétone, sulfate de sodium anhydre, phosphate de sodium (28mM), molybdate d'ammonium (4mM), ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) (1%), trichlorure de fer ($FeCl_3$) (0.1%), eau oxygénée (H_2O_2) (1M, 10mM), persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) (2,45mM), diméthylsulfoxyde (DMSO).

II.1.6. Appareillage : L'appareillage utilisé est le suivant :

- ✓ Autoclave (Pbibrand) ;
- ✓ Bain Marie (Gerhardt Bonn, Memmert) ;
- ✓ Balance (Sartorius) et balance analytique (Kernals 220.4N) ;
- ✓ Centrifugeuse électrique (Hettich) ;
- ✓ Etuves (Memmert) ;
- ✓ Evaporateur rotatif type HEIDOLPH;
- ✓ pH mètre (Hanna);
- ✓ Réfrigérateur (condor) ;
- ✓ Spectrophotomètre UV-Visible (Jenway) ;
- ✓ Vortex électrique (VWR) ;
- ✓ Pied à Coulisse (STANLEY 1/10) ;
- ✓ Agitateur magnétique (Stuart SB162) ;
- ✓ Broyeur (Retsch) ;
- ✓ Cellule de Malassez ;
- ✓ Microscope (Olympus) ;
- ✓ HPLC (SHIMADZU).

II.2. Méthodes

II.2.1. Détermination des paramètres morphologiques du fruit entier d'*Arbutus unedo* L.

La détermination des caractéristiques morphologiques est réalisée sur 03 fruits de chaque échantillon de chaque stade de maturation. La méthode d'échantillonnage est hasardeuse.

Pour chaque échantillon, nous avons déterminés les paramètres suivants:

- ✓ Les dimensions du fruit entier (longueur, largeur) au moyen d'un pied à coulisse,
- ✓ Le poids de fruit entier au moyen d'une balance.

II.2.2. Détermination du pH

2g du fruit coupé en petits morceaux ont été pesés, puis 20 ml d'eau distillée ont été ajoutés puis **mélanger pendant 5 minutes** jusqu'à l'obtention d'un jus (AOAC, 2000). La mesure a été réalisée en **plongeant l'électrode du pH mètre** dans la solution.

II.2.3. Extraction des antioxydants contenus dans le fruit d'*Arbutus unedo* L.

L'extraction des flavonoïdes et tannins a été réalisée à partir de la poudre de fruits rouges et verts congelés, obtenue après un découpage, séchage à l'étuve à 37°C, puis un broyage et tamisage.

II.2.3.1. Extraction des flavonoïdes

10g de poudre de fruit mature (rouge) ont été macérés trois fois à l'éther de pétrole (chacun 40ml) pendant 3 heures à 50 °C (He-Long et al., 2010). La poudre a été macérée trois fois avec 70% d'éthanol (matière première : taux de solvant était de 1 : 10 m/v) pendant 90 min à 100°C. L'extrait a été rassemblé et concentré sous vide pour recueillir le résidu aqueux (10ml) qui a été extrait avec du chloroforme (40 ml), puis on l'acidifie avec H₂SO₄ à 20% (pH = 5) et on extrait avec l'acétate d'éthyle (40 ml). L'apparition d'un précipité d'interphase a été observé lors de l'extraction avec de l'acétate d'éthyle. Les fractions d'acétate d'éthyle ont été prises comme extrait de flavonoïdes (Chirikova et al., 2010).

II.2.3.2. Extraction des caroténoïdes

Les caroténoïdes ont été extraits comme décrit par Rodriguez-Amaya et al. (1976), avec quelques modifications. Environ 10 g de fruit rouge ont été triturés avec de l'acétone froide (120 ml), filtrés sous vide à travers un entonnoir Büchner. Des additions successives de 25 ml d'acétone ont été faites et filtrés sous vide jusqu'à ce que l'échantillon devienne incolore, ce dernier a été transféré à l'éther de pétrole froid (183.3 ml). L'extrait a été concentré dans un évaporateur rotatif à une température de 35-37 °C. Enfin, les caroténoïdes ont été récupérés avec le méthanol et conservés congelés (à environ -5°C) dans des flacons en verre ambré jusqu'à l'analyse.

II.2.3.3. Extraction des tannins

5g de poudre de fruit immature (vert) a été dégraissée en les laissant macérer dans 16.6ml d'éther de pétrole pendant 24 heures. Après filtration, le marc est récupéré alors que la chlorophylle et les lipides sont éliminés. Le marc récupéré est repris par 8.33 ml d'éther diéthylique ensuite il sera filtré pour éliminer les phénols, les catéchines et le reste. Le marc est repris une deuxième fois par 16.6ml de méthanol. Il est filtré dans un ballon préalablement pesé. Le filtrat méthanolique est

soumis à une évaporation sous vide pour obtenir un résidu sec. C'est un extrait pur de tannins qui sera pesé (Bruneton, 1999).

II.2.4. Dosage des antioxydants de l'extrait

II.2.4.1. Les flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par **Zhishen et al. (1999)**. Une quantité de 500µl de l'extrait méthanolique (2mg/ml) est ajoutée à 1500µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5% sont ajoutés au mélange. Après 5 min, 150µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % (m/v) sont rajoutés. Après une incubation de 6 min à la température ambiante, 500µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) sont additionnés. Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des fruits est exprimée en milligramme (mg) équivalent de quercétine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EQ)/g).

La concentration en flavonoïdes contenus dans les extraits de fruit a été calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard (**Annexe I**).



II.2.4.2. Les caroténoïdes totaux

Pour déterminer la teneur en caroténoïdes totaux, 1g d'échantillon a été pesé. Pour l'extraction des caroténoïdes, des additions successives de 1.66 ml d'acétone ont été faites pour obtenir une pâte, qui a été filtrée sous vide. Cette procédure a été répétée 8 fois jusqu'à ce que l'échantillon devienne incolore (**Carvalho, et al., 2012**).

L'extrait obtenu a été transféré dans une ampoule à décanter de 500 ml contenant 21.3 ml d'éther de pétrole. L'acétone a été éliminée par une addition lente d'eau distillée afin d'empêcher la formation d'émulsion. La phase aqueuse a été jetée. Cette procédure a été répétée quatre fois jusqu'à ce qu'un solvant résiduel ne soit resté. Ensuite, l'extrait a été transféré à travers un entonnoir dans une fiole jaugée de 50 ml contenant 0.2 g de sulfate de sodium anhydre. Le volume a été constitué par l'éther de pétrole et les échantillons ont été lus à 450 nm. La teneur en caroténoïdes totaux a été calculée selon la formule suivante (**Carvalho, et al., 2012**) :

$$\text{Teneur en caroténoïdes } (\mu\text{g} / \text{g}) = A \times V (\text{ml}) \times 10^4 / A_{1 \text{ cm}} \times P (\text{g})$$

D'où : A = Absorbance ; V = Volume d'extrait total ; P = Poids d'échantillon

1 %
 $A_{1\text{ cm}} = 2592$ (Coefficient d'extinction de β -carotène en éther de pétrole).

II.2.4.3. Les tannins

a. Les tannins totaux

Les tannins ont été déterminés par la méthode de Folin – Ciocalteu. 400 μ l de l'extrait ont été ajouté à un ballon volumétrique (10ml) contenant 2 ml de Folin – Ciocalteu dilué 10 fois et 1.6 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7.5%. Le mélange a été bien agité et maintenu à température ambiante pendant 30 min. Une série de solutions étalon d'acide gallique (20, 30, 40, 50 μg /ml) ont été préparés de la même manière que celle décrite précédemment. L'absorbance des échantillons et des solutions standards ont été mesurés par rapport au blanc à 765 nm avec un spectrophotomètre UV / Visible. La teneur en tannin a été exprimée en terme de mg EAG / g d'extrait en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe I) (Miean et Mohamed, 2001 ; Marinova et al., 2005).

b. Les tannins condensés

La quantité de tannins condensés est estimée en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide (Julkunen-Titto, 1985). Un volume de 100 μ l d'extrait (0.4 mg/ml) est ajouté à 3000 μ l de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v), puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 1500 μ l de chlorhydrique concentré (HCl) est additionné et laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance à 550 nm est mesurée contre un blanc.

La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC / g MS) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe I).

c. Les tannins hydrolysables

La teneur en tannins hydrolysable a été déterminée par le test d'iode de potassium décrit par Bossu et al. (2006). 5ml de la solution aqueuse de KIO_3 (2.5% v/v) ont été chauffé pendant 7 min à 30°C, puis 1 ml d'extrait (0.4mg/ml) a été ajouté. Le mélange a été ensuite placé dans un bain d'eau à 30°C pendant 2 min avant la lecture d'absorbance à 550 nm. Les solutions étalons de l'acide tannique ont été préparées par une dilution aqueuse. Les résultats ont été exprimés par milligramme équivalent d'acide tannique (EAT) par gramme de matière sèche (mg TAE / g MS) en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe I).

II.2.4.4. Analyse qualitative par HPLC

20µl de chaque extrait ont été injectés sur une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125 x 4.6 mm. La phase mobile est constituée de trois éluants : méthanol, eau distillée, acide acétique (47: 50: 2.5) (V /V/V). Le gradient d'élution appliqué est de type isocratique étalé sur 10 min. Le débit est de 0.5 ml / min. La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde égale 254 nm (Gomez-Caravaca et al., 2006).

II.2.5. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de fruit

II.2.5.1. Activité antioxydante totale (TAC)

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait méthanolique à la concentration 0.4 mg/ml est mélangé avec 3 ml de la solution du réactif (0.6 M acide sulfurique (1ml), 28 mM phosphate de sodium (1ml) et 4mM molybdate d'ammonium (1ml)). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe I) (Prieto et al., 1999).

II.2.5.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par Oyaizu (1986). 1ml de chaque concentrations de chaque extrait méthanoliques (0,2 ; 0,4, 0,6 et 0,8 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de solution de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de $FeCl_3$ (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour chaque fruit. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

II.2.5.3. Test du blanchissement du β -carotène

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de blanchissement du β -carotène repose sur la mesure d'inhibition des composés organiques volatils et des hydro-péroxydes conjugués diène résultant de l'oxydation d'acide linoléique (Dapkevicius et al., 1998).

Le test du β -carotène/acide linoléique a été réalisé suivant la méthode décrite par Kelen et Bektas (2008) avec une seule modification, usage du Tween 80 au lieu de Tween 40. 0.5 mg de β -carotène ont été dissous dans 1 ml de chloroforme, la solution obtenue a été introduite dans un ballon contenant 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 80.

Après évaporation du chloroforme sous vide (40 °C), 100 ml d'eau oxygénée ont été ajoutés avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution, 4 ml ont été transférés dans un tube contenant 200 μ l de l'extrait à différentes concentrations (0,2 ; 0,4 ; 0,6 et 0,8 mg/ml). Ce système d'émulsion a été incubé pendant 48 heures à l'obscurité, avec répétition du même procédé pour l'antioxydant synthétique l'hydroxytoluènebutylé (BHT) aux mêmes concentrations que les extraits et le tube blanc.

L'absorbance a été mesurée à 490 nm et l'activité antioxydante relative (AAR) a été calculée selon la formule suivante:

$$\text{AAR (\%)} = (A_{\text{échantillon}} / A_{\text{BHT}}) \times 100$$

Où: A est l'absorbance

II.2.5.4. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 scavenging activity)

Le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être déterminé par la méthode décrite par Ruch et al. (1989) : Une solution d' H_2O_2 (10 mM) a été préparée dans un tampon phosphate (pH 7,4). Le mélange réactionnel est composé de 0.6ml de cette solution et de 1ml de chaque extrait à différentes concentrations (0,2 ; 0,4 ; 0,6 et 0,8 mg/ml). Les valeurs d'absorbance ont été mesurées après 60 min à 240 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard.

Le pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ Piégeage } \text{H}_2\text{O}_2 = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100$$

Où:

A_0 : absorbance d' H_2O_2 ;

A_1 : absorbance de mélange réactionnel.

antimicrobienne est détectée par la présence d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné d'extrait et en fonction du diamètre de ces zones, la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante (Osato, 2009).

II.2.7. Utilisation des extraits dans le processus de la conservation

II.2.7.1. Préparation des extraits et des échantillons

A partir des extraits bruts, des extraits de flavonoïdes, de tannins et de caroténoïdes à concentration de 2 g/ml ont été préparés en utilisation l'eau distillée.

La sardine (*Sardina pilchardus*) est achetée fraîchement au marché local de Jijel. Elle est acheminée au laboratoire dans une enceinte isothermique de type glacière, puis étêtée, éviscérée, nettoyée, rincée à l'eau distillée stérile et laisser égouttée.

II.2.7.2. Essai de conservation de la sardine (*Sardina pilchardus*) par les différents extraits

Des filets de la sardine fraîche sont déposés dans des plateaux recouverts avec du papier sulfurisé, puis ils ont été inoculés en surface à l'aide d'un pinceau stérile avec une suspension de *Staphylococcus aureus* à dilution de 10^{-5} (10^7 UFC /ml).

Chaque extrait méthanolique de concentration de 2g/ml a été étalé sur la surface des filets de la sardine déjàensemencé par l'inoculum de *Staphylococcus aureus*, cette opération a été répétée deux fois.

Des filets de la sardineensemencés par l'inoculum de *S. aureus* sans application d'extrait ont constitué les échantillons témoins positifs.

Les différents échantillons sont ensuite conservés à une température de réfrigération de $6 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 15 jours. Les analyses ont été réalisées en double répétitions chaque trois jours (J_0 , J_3 , J_6 , J_9 , J_{12} , J_{15}) (Caillet et Lacroix, 2007).

II.2.7.3. Contrôle de la qualité de la sardine

II.2.7.3.1. Contrôle microbiologique de la sardine

Avant inoculation avec la solution diluée 10^{-5} de la souche *Staphylococcus aureus* et l'addition des différents extraits à 2g/ml, la charge microbienne initiale des filets de la sardine a été évaluée. Le contrôle microbiologique a été réalisé selon les techniques décrites par Guiraud et Galzy (1980), Beerens et Luquet (1987) et Guiraud (2003) :

- ✓ **Préparation de la solution mère et des dilutions décimales** : une solution mère a été préparée en mélangeant 1g de la chair de sardine broyée avec 9ml d'eau physiologique

stérile. Des dilutions décimales ont été préparé à partir de la solution mère jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-7} .

- ✓ **Dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants** : Le dénombrement a été réalisé sur gélose désoxycholate, par ensemencement en masse de 1ml de la dilution 10^{-3} pour les coliformes totaux suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h et de la dilution 10^{-2} pour les coliformes thermotolérants suivi d'une incubation à 44°C pendant 24h. On compte toutes les colonies roses-rouges qui apparaissent après ce temps d'incubation.
- ✓ **Recherche de *Staphylococcus aureus*** : Le milieu Giolitti Contonii (9 ml) a été inoculé par 1ml de la solution mère de la sardine puis incubé à 37°C pendant 24h. Après incubation, s'il y a un noircissement du milieu, la présence de *Staphylococcus aureus* est suspectée, on procède alors à un isolement sur gélose Baird Parker.

☞ Isolement

A partir du tube positif, prélever aseptiquement 0.1 ml et l'ensemencer à la surface d'une boîte pétrie contenant la gélose Chapman. Incuber à 37°C pendant 24h.

Les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent lisses entourées d'un halo jaune brillant.

- ✓ **Recherche de *Salmonella*** : Un pré-enrichissement par ensemencement de 1ml de la solution mère de la sardine dans 9ml du milieu eau peptonée alcaline a été réalisé. Après incubation à 37°C pendant 24h, la présence probable de salmonelle se traduit par un trouble du milieu, un isolement doit être donc pratiqué sur gélose Hecktoen.

II.2.7.3.2. Détermination du pH de la sardine

2g de la sardine ont été pesé puis 20 ml d'eau distillée ont été rajouté et mélangé pendant 5 minutes jusqu'à l'obtention d'une solution (AOAC, 2000). La mesure a été réalisée en plongeant l'électrode du pH mètre dans cette solution et la valeur du pH est enregistrée sur l'écran de l'appareil.

II.2.7.3.3. Contrôle des échantillons pendant la conservation

- ✓ **Détermination du pH** : La variation du pH de la chair de poisson pendant les jours de la conservation a été évaluée comme décrit précédemment.
- ✓ **Evaluation du nombre de *S. aureus*** : Afin de déterminer l'effet des différents extraits d'arbose appliquées à la sardine inoculée par la bactérie test, des analyses

microbiologiques sont effectuées pour suivre la cinétique de la croissance bactérienne en présence et / ou en absence des différents extraits.

Les dénombrements des bactéries sont réalisés à partir des prélèvements de trois jours (J_0 , J_3 , J_6 , J_9 , J_{12} , J_{15}). Pour cela, une solution mère a été préparée en mélangeant 1g de la chair de sardine broyée avec 9ml d'eau physiologique stérile. Des dilutions décimales ont été préparé à partir de la solution mère jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-5} . L'ensemencement de 0.1ml de cette dernière est effectué dans des boites de Pétri contenant la gélose Baird Parker puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

La lecture est réalisée par comptage direct des colonies caractéristiques pour l'espèce. Le dénombrement est exprimé en UFC/g comme étant la moyenne de deux déterminations.

II.3. Analyse statistique des résultats

Les moyennes et les Ecart-types ont été calculées pour les différents résultats. Cette analyse a été effectuée avec le logiciel Microsoft Office Excel 2007.

L'analyse statistique est réalisée en utilisant le test de Student pour la comparaison de deux échantillons. L'étude de la variance a été utilisée pour déterminer les différences significatives entre les différents traitements. Les différences entre les moyennes ont été testées par le logiciel IBM SPSS Statistics. Les valeurs de $p < 0.05$ sont considérées significativement différentes.

III- Résultats et discussion



III.1. Les caractéristiques morphologiques du fruit d'*Arbutus unedo* L.

Les résultats de l'étude des caractéristiques morphologiques de fruit en trois stades de maturation (vert, jaune et rouge) sont récapitulés dans le tableau 03. D'après ces résultats, il ressort que le poids moyen du fruit entier est de 3.43 ± 1.46 g, 4.16 ± 1.069 g et 4.33 ± 1.150 g pour le fruit aux stades vert, jaune et rouge respectivement. En outre la longueur de ce fruit variée de 1.73 ± 0.49 à 2.23 ± 0.41 cm, la largeur variée de 1.63 ± 0.32 cm à 2.06 ± 0.15 cm dont le ratio longueur/largeur, est de 0.91 ± 0.11 , 1.06 ± 0.07 et 1.08 ± 0.12 pour les fruits vert, jaune et rouge respectivement, ce qui explique la forme arrondi de ce fruit.

Selon l'étude morphologique réalisée sur le même fruit au stade rouge par **Celikel et al. (2008)**, la largeur et la longueur de ce dernier sont respectivement $2.11 \text{ cm} \pm 0.7$ et $2.30 \text{ cm} \pm 0.66$, d'autre part, **Vitale (2012)** a trouvé des dimensions inférieure pour un fruit de poids moyen de 5.26 ± 1.77 g.

Tableau 03. Paramètres morphologiques d'*Arbutus unedo* L. aux trois stades de maturation.

Paramètres	Valeur moyennes		
	Fruit vert	Fruit jaune	Fruit rouge
Poids de fruit entier (g)	3.43 ± 1.46	4.16 ± 1.069	4.33 ± 1.15
Longueur de fruit (cm)	1.8 ± 0.17	1.73 ± 0.49	2.23 ± 0.41
Largeur de fruit (cm)	1.96 ± 0.25	1.63 ± 0.32	2.06 ± 0.15
Ratio : longueur/largeur	0.91 ± 0.11	1.06 ± 0.07	1.08 ± 0.12

Lamare et al. (2013) ont expliqué l'augmentation de la longueur, de la largeur et du poids de fruit par l'augmentation de la taille des cellules en raison de la division et de l'élongation de ces dernières ce qui permis l'accumulation maximale des nutriments.

III.2. Détermination du pH

Les valeurs moyennes du pH des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation sont résumées dans le tableau 04. D'après ces résultats, il apparait que le pH de l'échantillon a une tendance à augmenter lorsque les fruits passent vers le stade de maturation. En effet, il varie de 3.51 ± 0.015 pour le fruit immature à 4.03 ± 0.057 pour le fruit mature, dont la valeur intermédiaire a été enregistrée avec le fruit jaune, 3.70 ± 0.005 .

Le pH est un autre paramètre déterminant l'aptitude à la conservation des aliments, il constitue l'un des principaux obstacles, que la flore microbienne doit franchir pour assurer sa prolifération. Ainsi, un pH de l'ordre de 3 à 6 est très favorable au développement des levures et moisissures (Gatel, 1982 ; Giddey, 1982 ; Brissonet et al., 1994). Cependant, les bactéries préfèrent des milieux neutres, en général des pH entre 7 et 7.5 avec pour la plupart des tolérances à des variations entre 6 et 9 (Amellal, 2008).

Tableau 04. pH des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation

Fruits	pH
Vert	3.51 ± 0.015
Jaune	3.70 ± 0.005
Rouge	4.03 ± 0.057

Si on se réfère aux travaux de Serçe et al. (2010) et d'Özcan et Haciseferoğulları (2007), qui ont trouvé des valeurs de pH de ($5.57 \pm 0,07$) et ($4.6 \pm 0,1$) respectivement pour le même fruit, on constate qu'elles sont largement supérieures aux valeurs que nous avons obtenues. Tandis que, d'après Doukani et Tabak (2015), qui ont trouvé des valeurs de pH de 3.55 cas d'arboise de Tiaret ; et 3.53 cas d'arboise de Tlemcen, on constate qu'elles sont proches aux valeurs que nous avons obtenues. D'après Messaid (2007) et Huberson (2008), ces différences notées sont tributaires d'un grand nombre de facteurs parmi lesquels la région, les conditions climatiques et l'état de la maturation du fruit.

III.3. Détermination de la teneur en antioxydant

III.3.1. Rendement d'extraction

Les extraits bruts récupérés après évaporation sous vide ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Le rendement a été déterminé par rapport à 100g de matériel végétal sec et broyé. La figure 08 illustre les résultats obtenus pour le rendement d'extraction des 03 extraits du fruit d'arbousier.

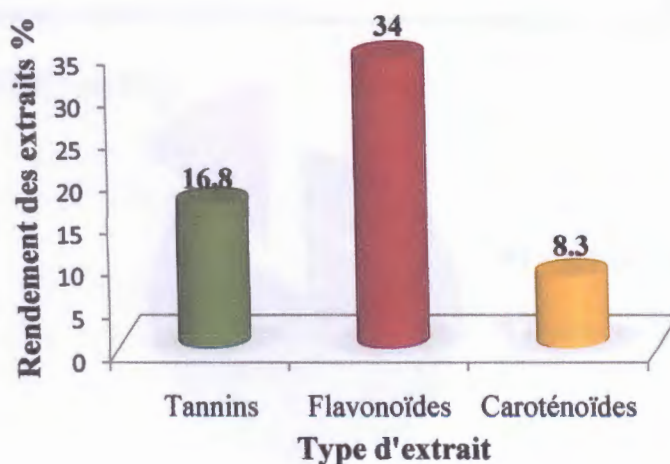


Figure 08. Rendement d'extraction de composés phénoliques de fruit d'*Arbutus unedo*.

Nous constatons, comme le montre très clairement la figure 08, que l'extrait de flavonoïdes d'arbousier a donné le meilleur rendement d'extraction (34%) suivi par celui de tannins (16.8%), puis de celui des caroténoïdes (8.3%). D'après **Oliveira (2011)**, le rendement d'extraction des substances bioactives des fruits non mûres était de 24.8 ± 3.8 %, il était de 43.5 ± 5.5 % pour les fruits au stade intermédiaire de maturation et 45.0 ± 2.2 % pour les fruits mûres.

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre, cela peut être attribué aux facteurs climatiques et environnementaux à savoir la zone géographique, la sécheresse, le sol, les agressions et les maladies (**Ebrahimi et al., 2008**). De plus le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante jouent un rôle important (**Miliauskas et al., 2004**). La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des composés phénoliques (**Lee et al., 2003**).

III.3.2. Dosage des antioxydants

III.3.2.1. Teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g de MS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

La valeur moyenne de la teneur en flavonoïdes de l'extrait de fruit mûre d'arbousier est représentée par la figure 09.

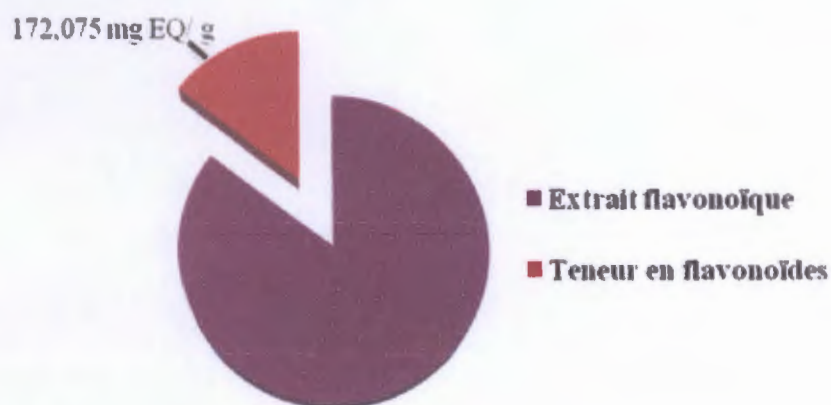


Figure 09. Teneur de l'extrait en Flavonoïdes.

D'après la figure 09, il ressort que la teneur en flavonoïdes du fruit est importante dans notre extrait, elle est de 172.07 ± 2.93 mg EQ/g MS. Les résultats concernant nos fruits rouges sont nettement supérieurs à ceux trouvés par **Barosse et al. (2010)** et **Gulen et al. (2012)** qui sont de 8.68 à 34.99 mg/g d'extrait et 3.05 ± 0.04 mg /g d'extrait respectivement. D'une manière générale, la teneur en flavonoïdes de nos fruits est supérieure à celles de quelques autres fruits sauvages étudiés par **Gulen et al. (2012)** à savoir *Lycium europaeum L.* (3.72 mg/100g d'extrait), *Prunus spinosa L.* (1.74 mg/100g d'extrait), *Rosa canina L.* (1.69 mg/100g d'extrait) et *Rubus sanctus L.* (1.88 mg/100g d'extrait).

Les teneurs élevées en flavonoïdes par comparaison aux composés phénoliques sont logiques étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols (**Boussahel, 2011**). En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (**Podsdek, 2007**). En plus la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee et al., 2003**).

III.3.2.2. Teneur en caroténoïdes

Les caroténoïdes peuvent être responsables de la couleur jaune de la pulpe des fruits tandis que d'autres pigments phénoliques tels que les anthocyanines déterminent la couleur rouge de la peau (**Proliac et Raynaud, 1981**).

La valeur moyenne de la teneur en caroténoïdes de l'extrait de fruit d'arbousier est représentée par la figure 10.



Figure 10. Résultats de dosage des caroténoïdes du fruit rouge d'*Arbutus unedo* L.

D'après les résultats présentés dans la figure 10, la teneur en caroténoïdes du fruit rouge d'*Arbutus unedo* L. est de 10.94 µg / g. Si on se réfère aux travaux de **Hegazy et al. (2013)**, qui ont trouvé une teneur de caroténoïdes de 30.67 mg/100g pour le même fruit, on constate qu'elle est largement supérieure à la valeur que nous avons obtenue. cela peut être attribué aux facteurs climatiques et environnementaux à savoir la zone géographique, la sécheresse, le sol. (**Ebrahimi et al., 2008**).

III. 3.2.3. Teneurs en tannins totaux, condensés et hydrolysables

La teneur en tannins totaux est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g de MS), celle des tannins condensés est exprimée en milligramme équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g de MS), alors que celle des tannins hydrolysables est exprimée en milligramme équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g de MS).

Les résultats du dosage des tannins totaux, condensés et hydrolysables du fruit vert d'*Arbutus unedo* L. sont représentés par la figure 11.

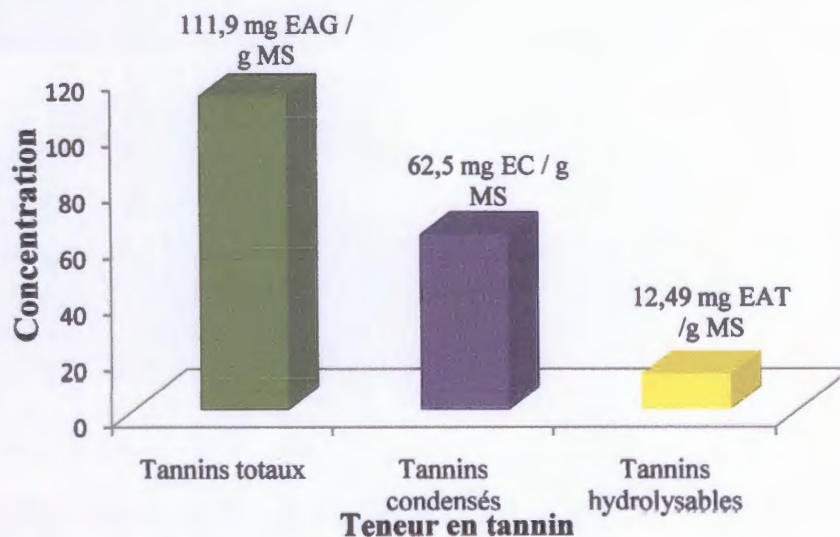


Figure 11. Teneurs en tannins totaux, condensés et hydrolysables du fruit vert d'*Arbutus unedo* L.

D'après la figure 11, on a pu remarquer que la teneur des tannins condensés et celle des tannins hydrolysables sont de l'ordre de 62.5 ± 44.19 mg EC/g MS et $12,49 \pm 12.62$ mg EAT/g MS respectivement, alors que la teneur des tannins totaux est de 111.9 ± 1.55 mg EAG / g MS.

Les tannins donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou le bétail (Eberhard *et al.*, 2005). Les plantes peuvent produire des substances phénoliques (tannoïdes) en réponse à un stress environnemental, suscité par différents facteurs: déficience en éléments nutritifs, sécheresse, surchauffage (températures élevées) et intensité lumineuse (Rira, 2006).

III.4. Analyse des extrait par HPLC

Les différents extraits ont été analysés afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir une information sur leurs composition en composés phénoliques par comparaison avec les différents étalons. Les chromatogrammes des trois extraits de fruit d'*Arbutus unedo L.* sont représentés par les figures 12, 13 et 14.

L'identification des pics générés a été effectuée par comparaison du temps des rétentions correspondant à ceux des acides phénoliques et antioxydant étalons analysés dans les mêmes conditions (Annexe III).

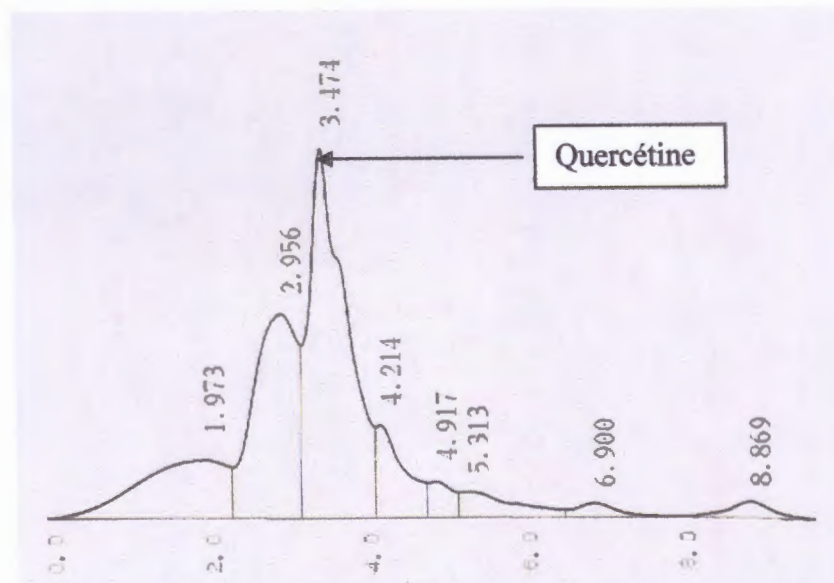


Figure 12. Chromatogramme de l'extrait flavonoïdique du fruit rouge analysé par HPLC.

Sur le chromatogramme de l'extrait flavonoïdique du fruit rouge d'*Arbutus unedo* L. il apparaît un grand nombre de pics, dont les plus importants sont apparus après des temps de rétention de 2.956 min et 3.474 min, le premier nous n'avons pas arrivé à l'identifier à cause du manque des étalons, cependant le deuxième correspond probablement à la quercétine ou à l'un de ses dérivés.

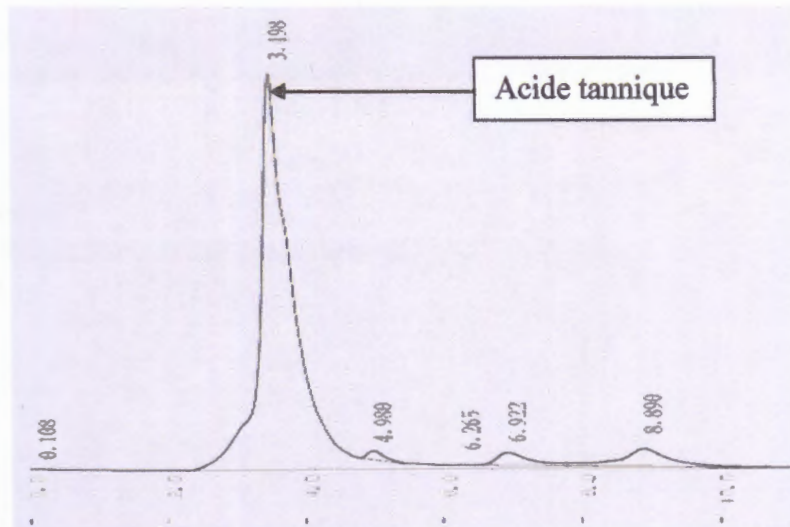


Figure 13. Chromatogramme de l'extrait tannique du fruit vert analysé par l'HPLC.

Concernant le chromatogramme de l'extrait tannique du fruit vert, il n'apparaît qu'un seul pic qui correspond probablement à l'acide tannique (3.498 min) ou à l'un de ses dérivés.

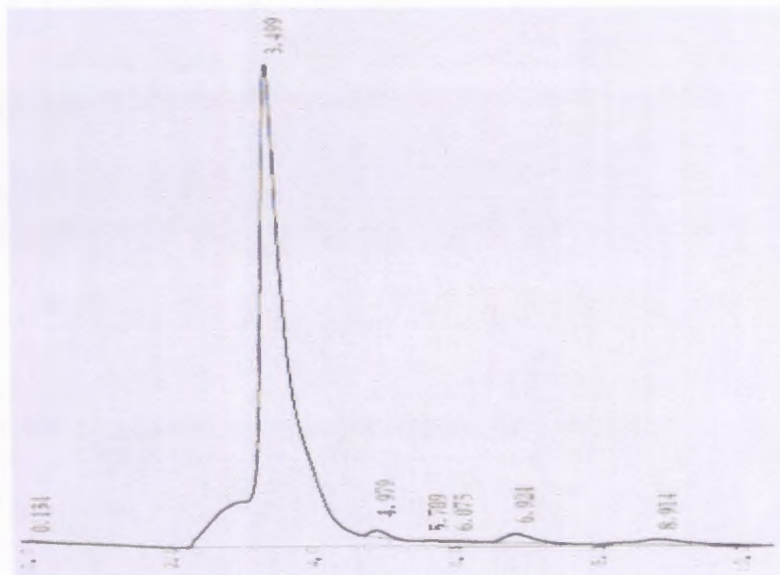


Figure 14. Chromatogramme de l'extrait caroténoïdique du fruit rouge analysé par l'HPLC.

Sur le chromatogramme de l'extrait des caroténoïdes du fruit rouge, le pic le plus important apparaît après un temps de rétention de 3.499 min qui reste non identifiable. D'une manière générale l'acide gallique et la vanilline ne sont pas détectés dans l'ensemble des extraits testés, d'autre part ces résultats montrent la présence de la quercétine et l'acide tannique dans l'extrait flavonoïdique et tannique respectivement.

Selon **Ganhão et al. (2010)**, les composés phénoliques de fruit d'arbousier mature sont la catéchine, l'acide hydroxybenzoïque, l'acide hydroxycinnamique, les flavonols, l'acide ellagique, les anthocyanines et les procyanidines. Tandis que l'acide quinique est repéré par **Alarcão-e-Silva et al. (2001)** en tant que le composé le plus important de fruit non mature et mature.

III.5. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de fruit

III.5.1. Activité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS). Les résultats sont résumés dans la figure 15.

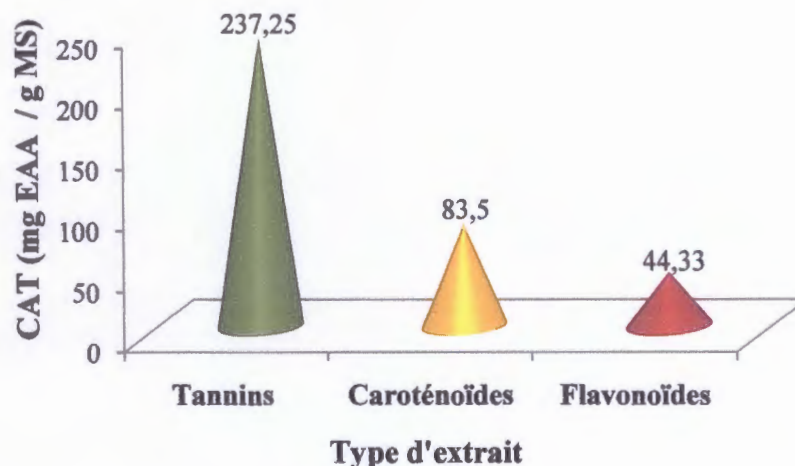


Figure 15. Capacité antioxydante totale des trois extraits méthanoliques du fruit d'*Arbutus unedo* L.

Nous constatons, comme le montre très clairement la figure 15, que les tannins d'arbousier ont donné la meilleure activité antioxydante totale (237.25 ± 1.76 mg EAA / g MS) suivi des caroténoïdes (83.5 ± 17.67 mg EAA / g MS), puis les flavonoïdes (44.33 ± 1.44 mg EAA / g MS).

Les tannins peuvent jouer le rôle d'antioxydants pour piéger les radicaux libres et pour arrêter de telles réactions préjudiciables (Chung et al., 1998). Selon Hatano et al. (1989) et Bors et Michel (1999), l'activité antioxydante élevée des tannins à poids moléculaire élevée est liée principalement à la présence d'un grand nombre des groupes phénoliques hydroxylés présentés par la molécule.

L'activité antioxydante des flavonoïdes est liée principalement à leurs structures chimiques. Ainsi, plusieurs travaux décrivent les relations structures-activités des flavonoïdes (Van Acker et al., 1995; Rice-Evans et al., 1996; Harborne et Williams, 2000). En plus, l'existence d'un nombre important de résidus hydroxyles augmente le potentiel antioxydant des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé (Fuhrman et al., 1995; Woodman et al., 2005).

Concernant les caroténoïdes, l'activité antioxydante de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure (Mortensen et al., 2001). En générale les plantes médicinales usitées dans les pharmacopées traditionnelles possèdent des propriétés antioxydantes (Speroni et al., 2000).

Le pouvoir antioxydant du fruit d'*Arbutus unedo* L. a été trouvé pour être l'un des plus élevés parmi 27 fruits d'Algérie étudiés par Allane et Benamara (2010).

III.5.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

La capacité réductrice des extraits testés se traduit par la réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) en donnant une couleur bleu (Chung et al., 2002). La figure 16 regroupe les résultats de l'étude de pouvoir réducteur des trois extraits méthanoliques de fruits d'*Arbutus unedo* L.

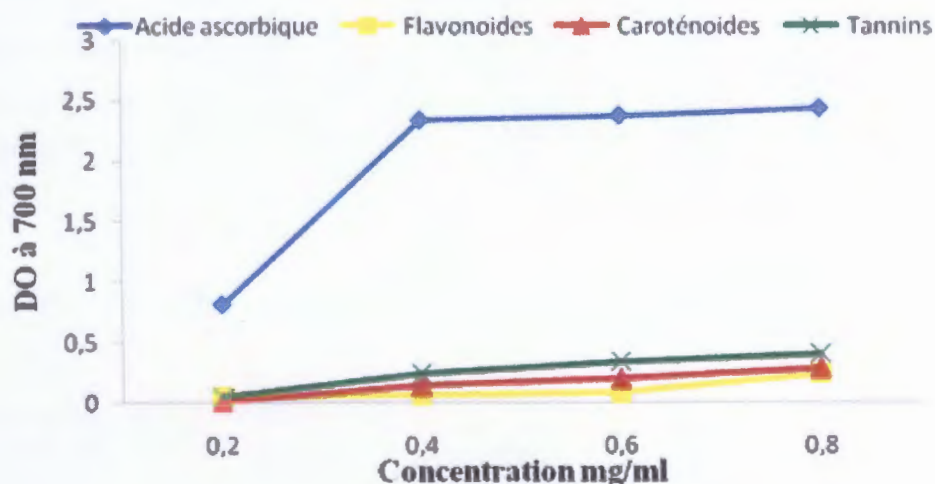


Figure 16. Pouvoir réducteur des extraits du fruit étudié.

En analysant la figure ci-dessus, on a pu remarquer que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos extraits, ce résultat a été confirmé par beaucoup d'auteurs (**Benhammou, 2006 ; Su et al., 2008, Liu et al., 2009**). Tous les extraits présentent des activités antioxydantes significatives ($p < 0.05$) nettement inférieures à celles du produit de référence (acide ascorbique). D'autre part, nous avons constaté que l'extrait tannique présente le meilleur pouvoir réducteur suivi par l'extrait des flavonoïdes.

L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés redox, qui peut jouer un rôle important en absorbant et en neutralisant les radicaux libres (**Chung et al., 2002**). Le pouvoir réducteur des fruits d'arbousier est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme réducteurs et inhibiteurs des oxydants (**Siddhuraju et Becker, 2007**). Quelques études ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jeong et al., 2004**). Par ailleurs, de nombreuses études ont évalué l'effet réducteur des ions ferreux par les extraits de diverses plantes. L'étude menée par **Jeong et al. (2004)** a montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle.

III.5.3. Test du blanchissement du β -carotène

La décomposition des acides gras est l'une des causes principales de la détérioration des aliments. De plus, l'inhibition de l'oxydation des acides gras par l'utilisation des conservateurs naturels, est une question importante dans l'industrie alimentaire (**Kartal et al., 2007**).

La technique de décoloration du β -carotène/ acide linoléique permet d'évaluer l'activité antioxydante des trois extraits par inhibition de la peroxydation des lipides. Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β - carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm (**Shon et al., 2003**). Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β - carotène (**Deba, 2008**).

L'activité antioxydante relative des trois extraits testés du fruit d'arbousier est donnée par la figure 17.

Il est clair d'après les résultats obtenus que la capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les extraits de fruits d'arbousier soit proportionnelle à l'augmentation de la concentration. L'extrait des caroténoïdes a montré la plus basse activité de piégeage d' H_2O_2 (résultat non significatif ($p>0.05$)), tandis que l'extrait flavonoïdique a montré la plus haute activité (résultat hautement significatif ($p<0.01$)) parmi les extraits étudiés, il possède aussi une capacité à piéger le peroxyde d'hydrogène plus élevée que celle de l'acide ascorbique utilisé comme un antioxydant de référence.

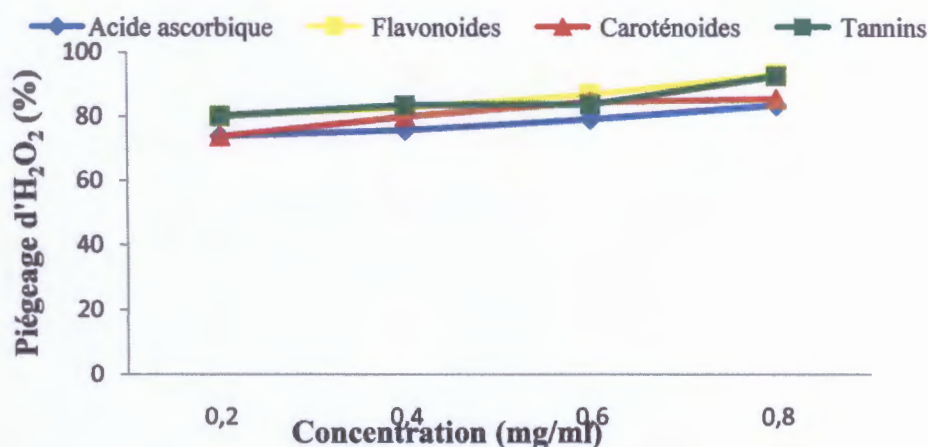


Figure 18. Pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène des extraits de fruit et de l'acide ascorbique aux différentes concentrations

Le peroxyde d'hydrogène est un dérivé non-radicalaire d'oxygène et considéré comme toxique pour les cellules car il permet la formation des radicaux hydroxyles à l'intérieur de la cellule (Shrinivas *et al.*, 2011).

Il est déjà prouvé que les polyphénols alimentaires protègent les cellules animales et bactériennes de la toxicité induite par H_2O_2 . Nos résultats indiquent que les composés antioxydants (flavonoïdes) dans nos extraits sont de bons donneurs d'électrons, ce qui permet l'accélération de la conversion du H_2O_2 en H_2O et donc l'élimination du H_2O_2 (Shon *et al.*, 2007; Atmani *et al.*, 2009).

III.6. Activité antimicrobienne des extraits

Le pouvoir antimicrobien des extraits d'*Arbutus unedo* L. a été étudié *in vitro* par la méthode de diffusion de disques sur la gélose Mueller-Hinton pour les bactéries et OGA pour les champignons.

III.6.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits a été estimée vis-à-vis de sept (07) souches cibles. Les moyennes des diamètres de zones d'inhibition pour chaque extrait sont représentées dans le tableau 05. Les résultats du tableau 05 montrent que les trois extraits du fruit d'*Arbutus unedo* L. exercent une activité inhibitrice plus ou moins prononcée sur toutes les souches bactériennes testées avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 5 mm et 19.5 mm.

Tableau 05. Activité antibactérienne de différents extraits.

Souches cibles	Diamètres de zones d'inhibition (mm)			DMSO
	Extrait flavonoïdes	Extrait tannins	Extrait caroténoïdes	
<i>L. monocytogenes</i>	14.5±0.70	11±1.41	10±00	04
<i>K. oxytoca</i>	10±00	5±1.41	12±00	05
<i>E. coli</i>	10±00	09±00	11±2.82	02
<i>S. aureus</i>	19.5±2.12	15±4.24	14±4.24	00
<i>Salmonella. sp</i>	16±00	12.5±3.53	11±1.41	02
<i>P. aeruginosa</i>	11.5±0.70	8±00	9±00	02
<i>A. baumannii</i>	19±5.65	12.5±0.70	17±5.65	04

Les extraits flavonoïdique et tannique montrent un effet inhibiteur assez élevé sur *Staphylococcus aureus* (Gram+) (figure 19) et ce avec des diamètres des zones d'inhibitions de 19.5±2.12 mm et 15±4.24 mm respectivement, alors que les souches (Gram-) *E. coli* (figure 20) et *Klebsiella oxytoca* (figure 24) s'avèrent plus résistantes que les autres souches avec des diamètres des zones d'inhibition de 10±00 mm et 05±1.41 mm respectivement.

Dans le cas d'extrait des caroténoïdes, on remarque que la souche la plus sensible est *Acinetobacter baumannii* (Gram-) (figure 25) qui donne un diamètre de la zone d'inhibition de 17±5.65 mm, alors que *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-) (figure 22) s'avère plus résistante que les autres souches avec un diamètre de la zone d'inhibition de 09±00 mm. Les résultats du DMSO montrent que ce solvant est approprié et ne présente presque aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes.

Selon Ulanowska et al. (2007), de nombreux composés flavonoïdiques sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et à Gram positif (*Staphylococcus aureus*). Doss et al. (2009) ont rapporté que les tannins exercent un effet bactériostatique sur différentes souches et notamment sur *E.coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, les polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes comme l'épigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine et la lutéoline sont des substances antibactériennes importantes (Shan et al., 2007 ; Askun et al., 2009). L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques (Dhaouadi et al., 2010).

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (Balentine et al., 2006).

III.6.2. Activité antifongique

L'activité antifongique des extraits a été testée vis-à-vis de quatre (04) souches. Les résultats des diamètres des zones d'inhibition des trois extraits sont récapitulés dans le tableau 06.

Tableau 06. Activité antifongique de différents extraits.

Souches cibles	Diamètres de zones d'inhibition (mm)			DMSO
	Extrait flavonoïdes	Extrait tannins	Extrait caroténoïdes	
<i>A. flavus</i>	15.5±2.12	1±1.41	00	00
<i>A. niger</i>	10 ±00	05± 1.41	12±00	00
<i>Penicillium</i>	10 ±00	09±00	11±2.82	00
<i>Fusarium</i>	19.5±2.12	15±4.24	14±4.24	00

L'analyse du tableau 06 montre clairement que les trois extraits étudiés possèdent une activité antifongique qui se diffère d'un extrait à un autre et d'une souche à une autre.

D'une manière générale, il apparaît que l'extrait flavonoïdique à l'effet antifongique le plus marqué dont les diamètres des zones d'inhibition varient de $10 \pm 00\text{mm}$ à $19.5 \pm 2.12\text{mm}$. Il apparaît aussi que *Fusarium* est la souche la plus sensible à l'effet de trois extraits étudiés (Figure 26).

Contrairement à l'extrait flavonoïdique, l'extrait de tannins et celui de caroténoïde exercent un faible pouvoir inhibiteur vis-à-vis *Aspergillus flavus* avec des diamètres des zones d'inhibition de $1 \pm 1.41\text{mm}$ et 00 mm respectivement.

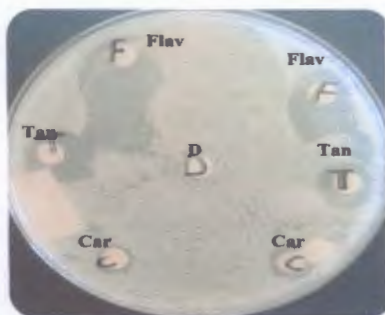


Figure 26. Activité antifongique des extraits testés : cas de *Fusarium*

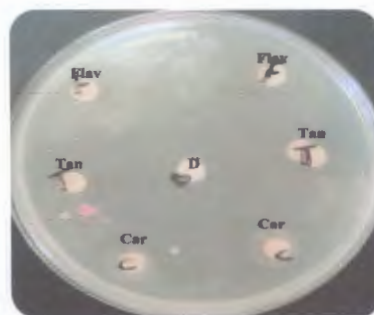


Figure 27. Activité antifongique des extraits testés : cas de *Penicillium*

Les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante ; l'une des études les plus importantes sur cette activité était celle d'Ortuno et al. (2006), qui ont démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones extraites de *Cirtus parasidi* et de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. Batawita et al. (2002), dans leur étude sur les flavonoïdes de *Conyza aegyptica L.*, ont aussi démontré que ces molécules avaient une action fongicide et fongistatique.

III.7. Essai de conservation de la sardine (*Sardina pilchardus*) par les différents extraits

III.7.1. Analyses microbiologiques de la sardine (matière première)

Les coliformes thermotolérants sont témoins de mauvaises conditions d'hygiène en l'occurrence l'hygiène du personnel. En effet, ils sont l'hôte du tube digestif de l'homme et des animaux. Leur présence est due à une contamination d'origine fécale (Jean-Louis, 2007). Leur recherche dans les poissons permet de suivre l'hygiène observée par les manipulateurs. Après la durée d'incubation, on a remarqué l'absence totale des coliformes totaux et thermotolérants ce qui témoigne que la sardine a été bien entretenue de la capture jusqu'à la vente

Concernant la recherche de *Staphylococcus aureus*, l'apparition d'un noircissement de milieu Giolitti Contonii après incubation à 37°C pendant 24h nous a conduits à faire un isolement sur

milieu Chapman. Les colonies de *Staphylococcus aureus* sont détectées par leurs formes rondes, régulières, bombées, opaques et pigmentées en jaune-doré; elles sont entourées d'un halo jaune (figure 28).



Figure 28. Colonies de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman.

Les produits de la mer peuvent être contaminés par les Staphylocoques soit par l'intermédiaire de manipulateurs infectés, soit par l'environnement. Lorsqu'il se multiplie dans les aliments, *Staphylococcus aureus* produit un certain nombre d'entérotoxines (vincenot et al., 2008).

Pour la recherche des salmonelles, après un pré-enrichissement dans l'eau peptonée alcaline, un trouble a été observé dans le milieu ce qui traduit la présence probable de salmonelle. Le résultat de l'isolement sur gélose Hecktoen est représenté par la figure 29, où on remarque l'absence des colonies vertes à centre noir qui caractérisent les Salmonelles sur cette gélose.



Figure 29. Recherche des salmonelles sur milieu Hecktoen

La plupart des études publiées indiquent que, les produits de la mer véhiculent beaucoup moins les salmonelles que d'autres aliments, et que les poissons ne sont responsable que d'une faible proportion de l'ensemble des cas de salmonellose enregistrées (Korsan et al., 2004).

III.7.2. Détermination du pH

Le pH de notre sardine fraîche est de 6.4 ± 0.28 , il appartient à l'intervalle donné par Haard (2002) qui trouve que le pH post mortem des poissons varié de 5.5 à 7.1 suivant la saison, les espèces et d'autres facteurs.

III.7.3. Contrôle des échantillons de la sardine pendant la conservation

III.7.3.1. Détermination du pH

Les résultats de la détermination du pH de la sardine pendant la conservation sont représentés par la figure 30.

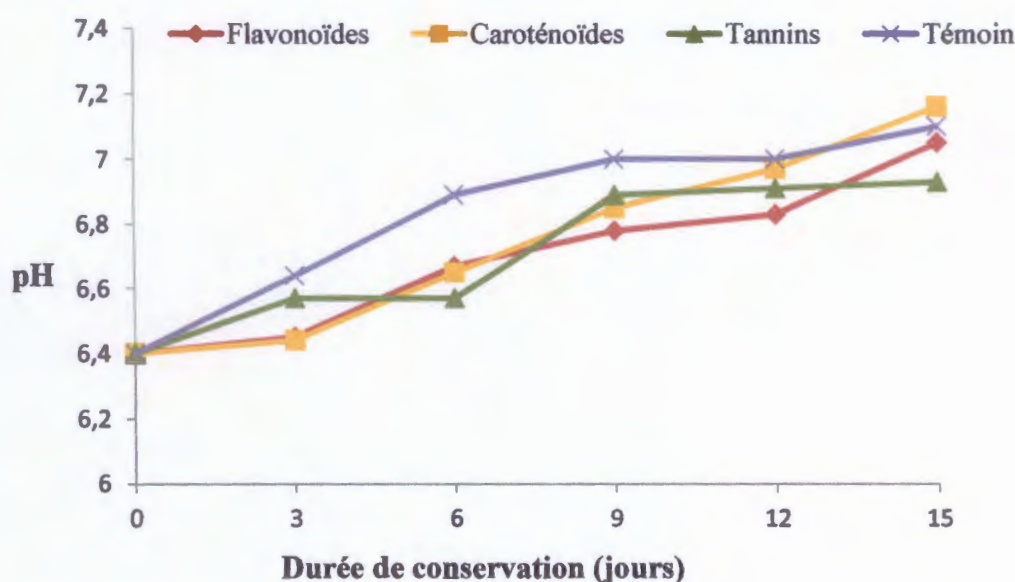


Figure 30. Variation du pH des filets de sardine au cours de la conservation

D'après la figure 30, on remarque que le pH de la sardine augmente avec le temps de la conservation pour tous les échantillons. On constate aussi que pendant les neuf (09) premiers jours, le pH du témoin était plus élevé que ceux des échantillons aux différents extraits.

Au dernier jour de conservation (J15), il apparaît que le pH des échantillons à l'extrait tannique est le moins élevé (6.93 ± 0.007) (résultat significatif $p < 0.05$) contrairement au pH des échantillons à l'extrait de caroténoïdes (résultat non significatif $p > 0.05$) qui a pris la valeur la plus élevée

(7.16 ± 0.10), ce qui nous a permis de conclure que l'extrait tannique a un effet dépresseur sur l'évolution du pH de la sardine.

Parmi les gènes du *S. aureus* on trouve l'opéron uréase, cet enzyme catalyse l'hydrolyse de l'urée en deux molécules de NH_3 et une de CO_2 contribuant ainsi à la désacidification et une augmentation du pH (Gautier et Le loir, 2010).

III.7.3.2. Evaluation de l'évolution du contaminant *S. aureus*

Cette étude visait en premier lieu à déterminer l'efficacité antimicrobienne des trois extraits obtenues à partir de fruit d'*Arbutus unedo L.* et en deuxième lieu à évaluer leur application sur un produit de la pêche largement consommé en Algérie pour tester leur efficacité antibactérienne.

En se basant sur les résultats de l'activité antibactérienne « *in vitro* », nous avons choisi la souche la plus sensible (*S. aureus*) aux trois extraits étudiés afin de suivre la cinétique de croissance de cette bactérie sur la sardine en présence des extraits.

La figure 31 montre les résultats de l'évolution du nombre de *S. aureus* inoculé sur la sardine (*Sardina pilchardus*) pendant 15 jours de conservation à $6 \pm 1^\circ\text{C}$.

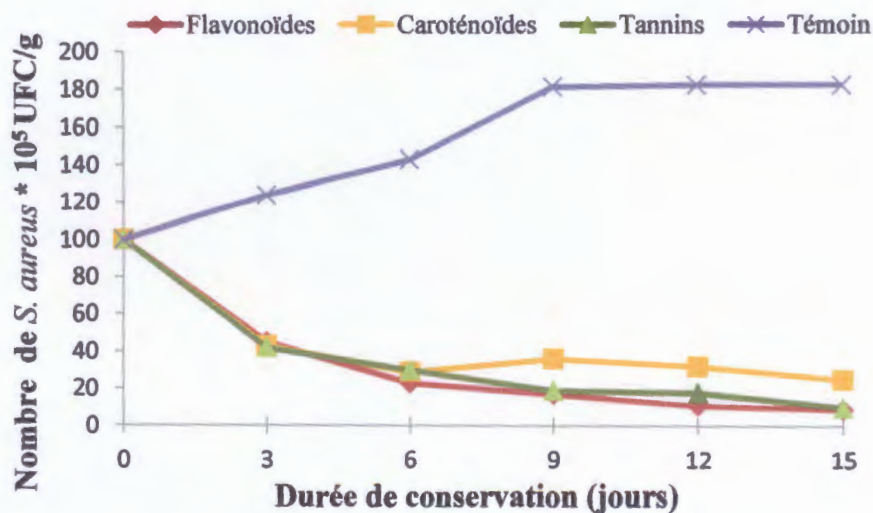


Figure 31. Evolution du nombre de *S. aureus* inoculé sur la sardine pendant la conservation

En analysant la figure ci-dessus, il ressort que le nombre de *S. aureus* contaminant les lots de poissons en présence de différents extraits diminue pendant la conservation de 10^7 UFC/g au premier jour à 9 ± 5.43 UFC/g, 25 ± 13.19 UFC/g et $10 \pm 4.12 \times 10^5$ UFC / g au dernier jour pour l'extrait des flavonoïdes, caroténoïdes et tannins respectivement. Tandis que le nombre de *S. aureus*

dénombré sur la sardine témoin augmente progressivement jusqu'à J12 ($182 \pm 11.31 \times 10^5$ UFC/g) où reste stable trois autres jours plus tard.

Ces résultats trouvés démontrent que les trois extraits sont dotés d'un fort pouvoir inhibiteur hautement significatif ($p < 0.01$) vis-à-vis de *S.aureus*. Toutefois l'activité bactéricide a été prononcée, surtout pour l'extrait flavonoïdique et tannique.

Djenane et al. (2002) ont rapporté que les viandes traitées avec des antioxydants naturels, emballées sous atmosphère modifiée, ont montré une stabilité chimique et microbiologique durant une longue période par rapport aux viandes non traitées. Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**).

Conclusion générale

Arbutus unedo L. est originaire des pays méditerranéens, il reste très négligé et n'a pas encore eu la place qu'il mérite dans les programmes de reboisement et ce, malgré les différentes études et résultats qui ont montré que cette espèce est très intéressante aussi bien du point de vue écologique (plasticité, résistance à la sécheresse, etc.), qu'économique (comme a source de couleurs et des saveurs, etc.).

De nombreuses recherches scientifiques ont démontré que ce fruit est riche en antioxydants (flavonoïdes, anthocyanidine, tanins, composés phénoliques), en sucres, en protéines, en vitamine C et en minéraux. En thérapeutique, ce fruit est connu pour ses effets astringents, diurétiques, et antiseptiques.

Les résultats des propriétés morphologiques des arbousiers étudiées sont intéressants. Le poids moyen du fruit entier est de 3.4g, 4.16g et 4.33g pour le fruit aux stades vert, jaune et rouge respectivement. Le ratio longueur/largeur, est de 0,91, 1.06 et 1.08 pour les fruits vert, jaune et rouge respectivement, ce qui explique la forme arrondi de ce fruit. Nos résultats montrent que le fruit d'arbousier est de nature acide, ce fruit présente aussi un faible pH qui varie entre 3.51 pour le fruit immature à 4.03 pour le fruit mature.

Le dosage des flavonoïdes, des tanins et des caroténoïdes a révélé une richesse en flavonoïdes et tanins, avec une faible teneur en caroténoïdes. Par ailleurs, l'évaluation du pouvoir antioxydant indique que l'extrait flavonoïdique des fruits matures montre la capacité antioxydante la plus élevée (piégeage du peroxyde d'hydrogène et blanchissement du β - carotène), cependant, pour l'activité antioxydante totale et le test de la réduction de fer, l'extrait des fruits verts a montré la meilleure activité.

Nous avons entrepris une étude sur le pouvoir antioxydant, antibactérien et antifongique des différents extraits phénoliques (Tannins, caroténoïdes et flavonoïdes) obtenus du fruit d'*Arbutus unedo L.* et d'analyser leur rôle éventuel dans le processus de bioconservation de la sardine commune. Les résultats de notre étude, nous a permis de prédire que ces substances naturelles peuvent être une source non négligeable d'antifongiques et d'antibactériens utilisables même dans la conservation de la sardine.

Concernant l'activité antimicrobienne, tous les extraits étudiés présentent une activité inhibitrice. Les résultats révèlent que la souche *S. aureus* est très sensible aux extraits flavonoïdique et tannique avec un diamètre des zones d'inhibition 19.5 et 15 mm respectivement. D'autre part, l'extrait flavonoïdique à l'effet antifongique le plus marqué. Il apparait aussi que *Fusarium* est la souche la plus sensible à l'effet de trois extraits étudiés.

Quant aux résultats de l'application des polyphénols sur la sardine, l'extrait flavonoïdique et tannique ont révélé un pouvoir antioxydant et antimicrobien intéressants. Nous pouvons conclure que ces extraits semblent être plus appropriés comme agents antimicrobiens dans la préservation de la sardine.

Il reste à dire qu'il faut compléter cette étude par des recherches qui s'orientent vers l'analyse de la composition détaillée de l'huile de pépin d'arbousier, des acides aminés qu'ils détient, des sucres qui le composent, des minéraux et des matière grasse qu'il peut avoir, cela pour susciter l'intérêt aussi bien pour des études nutritionnelles que pour son utilisation en thérapeutique, ce qui pourrait donner à l'arbousier un essor dans le contexte socio-économique.

*Références
bibliographiques*

- Aksil, T. (2015). *Caractérisation physicochimique du fruit de l'arbousier (Arbutus unedo L.) du north Algérien et de la datte (Mech-Degla)*. Thèse doctorat : Université M'Hamed Bougara. Boumerdes. 99p.
- Allane, T., Benamara, S. (2010). Antioxidant activities of some common and wild fruits from Algeria. *Phytothérapie*, 8(3), 171-175.
- Alarção-e-Silva, M.L., Leitão, A.E.B., Azinheira, H.G., Leitão, M.C.A. (2001). The Arbutus berry: Studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*. 14, 27- 35.
- Amellal, H. (2008). *Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes formulation d'un yaourt naturellement, sucré et aromatisé*. Thèse de Doctorat en Technologie Alimentaire : Université M'hamed Bougara. Boumérdes. 127p.
- Anthoni, J., Lionneton, F., Wieruszkeski, J-M., Magdalou, J., Engasser, J-M., Chebil, L., Humeau, C., Ghoul, M. (2008). Investigation of enzymatic oligomerization of rutin. *Rasayan Journal of Chemistry*, 1(4), 718-731.
- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. U.S.A: 17th Ed. Maryland.360.
- Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Ates, M. (2009). *In vitro* activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chemistry*, 116, 289-294.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbach, N., Atmani, D. (2009). Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112, 303- 309.
- Ayaz, F.A., Kucukislamoglu, M., Reunanen, M. (2000). Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) Fruits. *Journal of Food composition and Analysis*, 13, 171-177.
- Azza, S., Lyoussi B., Antunes D. et Miguel M.G. (2013). Physicochemical characterization and antioxidant activity of commercial Portuguese honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 1159-1165.
- Barros, L., Carvalho, A., Morais, J., Ferreira, I. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, 247-254.
- Batawita, K., Kokon, K., Akpagona, K., Koumaglo, K., Bouchet, P. (2002). Fungicide activity of a threatened species from togo flora: *Conyza aegyptiaca* (L.) Ait. var. *lineariloba* (DC.) O. Hoffm. (Asteraceae). *Acta Bot. Gal.*, 149 (1), 41-8.

- Beerens, H., Luquet, M.F. (1987). *Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et produits laitiers*. Paris : Tec & Doc, Lavoisier. 1-144.
- Benhammou, N. (2006). *Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles et des composés phénoliques de Pistacia lentiscus, Pistacia atlantica et Inula viscosa de la région de Tlemcen*. Thèse de Magistère en Biologie Option: Produits Naturels, Activités biologiques et Synthèse. 117p.
- Bors, W., Michel, C. (1999). *Biol. Med.*, 27, 1413–1426.
- Bossu, C.M., Ferreira, E.C., Chaves, F.S., Menezes, E.A., Nogueira, A.R. (2006). Flow injection system for hydrolysable tannin determination. *Journal of Microchemistry*, 84, 88-92.
- Boullard, B. (1997). *Dictionnaire: Plantes et Champignons*. Edition ESTEM. 55p.
- Boullard, B. (2001). *Plantes Médicinales du Monde; Réalités et Croyances*. Edition ESTEM. 50-80p.
- Bourgeois, L. (1991). *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*. 2^{ème} édition, ISBN : 2-85206-599-1, Paris : Lavoisier - TEC & DOC -75384. 454.
- Boweri, K., Siphoninus, (2000). *Map of Arbutus unedo*.
- Brissonnet, F., Bouix, M., Loiseau, G., Russel, A., Leveau, Y. (1994). *Le stress bactérien et ses conséquences en génie de l'hygiène*. Industrie Agro-Alimentaire. 106-114.
- Brown, J. E., H., Khodr, H., Hider, R. C., Rice-Evans, C. (1998). Structural dependence of flavonoïds interactions with Cu²⁺ ions: implication for their antioxidant properties. *The Biochemical journal*, 330, 1173-1178.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3^{ème} édition, Paris : Tec et Doc, Lavoisier. 1120p.
- Bruneton, J. (1999). Tannins. In: *Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales*. Paris: Tec & Doc. 369-404p.
- Caillet, S., Lacroix, M. (2007). *Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire*. Laboratoire de recherche en sciences appliquées à l'alimentation. Institut Armand - Frappier, Université de Laval (Québec).
- Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M-P., Hasselmann, M., Leverve, X. (2006). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Edition Springer. 255p.
- Carvalho, L., Gomes, P., Oliveira, R., Pacheco, S., Monte, P., Carvalho, J., Nutti, M., Neves, A., Vieira, A., Ramos, S. (2012). Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International*, 47, 337–340.

- Causse, C. (2005). *Les secrets de santé des antioxydants : C'est naturel, c'est ma santé*. Alpen éditions s.a.m., 30p.
- Celikel, S., Demirsoy, L., Demirsoy H. (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). Selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, **118**, 115-119.
- Chirikova, N.K., Olennikov, D.N., Tankhaeva, L.M. (2010). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **36** (7), 915-922.
- 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* IMRNK1. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 2454-2458.
- Chung, K.T., Wei, C.I., Johnson, M.G. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends Food Science and Technology*, **9**, 168-175.
- Correia, A.V., Oliveira, A. C. (2002). *Principais species florestais cominteresse para Portugal: Zonas de influência Mediterrânica*. 2^a Edição. Lisboa, Direcção Geral das Florestas. 67-69.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*, **1**, 569-590.
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 564-582.
- Dacosta, E. (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. Paris : Yves Dacosta (éd).317p.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T.A., Linssen, P.H. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science Food and Agriculture*, **77**, 140 -146.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Beek, T., Linsen, J.P.H. (1999). Antioxydant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal Science of Food and Agriculture*, **77** (1), 140-146.
- Deba, F., Dang Xuan, T., Yasuda, M., Tawata, S., (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*, **19**, 346-352.
- Demirsoy, H., Demirsoy, L., Çelikel, G., Koyuncu, T. (2007). Effects of Dried on some properties of Strawberry Tree Fruits. *Asian journal of chemistry*, **19**(3), 1777-1782.
- Dhaouadi, K., Raboudi, F., Estevan, C., Barrajo_n, E., Vilanova, E., Hamdaoui, M., Fattouch, S. (2010). Cell Viability Effects and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolic Extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **59**, 402-406.

- Dib, M.A. (2008).** *Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de quelques polyphénols présents dans Arbutus unedo L.* Thèse de Doctorat en Microbiologie : Université Abou Bakr Belkaid. Tlemcen. 140 p.
- Didi, A. (2009).** *Etude de l'activité antioxydante des flavonoïdes de l'Arbutus unedo L. et du Daphne gnidium L. de la région de Tlemcen.* Mémoire de Magister : Université Aboubekr Belkaïd. Tlemcen. 128p.
- Djenane, D., Sánchez-Escalante, A., Beltrán, J. A., Roncalés, P. (2002).** Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, **76**, 407-415.
- Doss, A., Mohammed Mubarack, H., Dhanabalan, R. (2009).** Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* L. *Indian Journal of Science and Technology*, **2**, 41- 43.
- Eberhard, T., Robert, A., Annelise, L. (2005).** *Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles.* Paris : Tec et Doc, France. 521p.
- Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., Yousefzadi, M. (2008).** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry*, **110**, 927-931.
- El Hoaouari, M., J.J. Lopez, J. J., Mekhfi, H., Rosado, J. A., Ginés, M. S. (2007).** Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *Journal of Ethnopharmacology*, **113**, 325-331.
- Favier, A. (2003).** *Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.* L'Actualité chimique. 108-117p.
- Fernandez, M. T., Mira, M. L., Florancio, M. H., Jennings, K. R. (2002).** Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **92(2)**, 105-111.
- Feucht, W., Treutter, D. (1999).** The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: *Principles and practices in chemical ecology*, PRESS et BOCA RATON (Eds.). 307-338p.
- Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpao, R., Tyagi M., Pontes, V., Alves, P.M., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R.B., Santos, C.N. (2010).** Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, **2**, 214-229.
- Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M., (1995).** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **61**, 549-554.

- Ganhão R., Morcuende D., Estévez M., 2010.** Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, **85**, 402–409.
- Garry, P., Christeans, S., Cartier, P. (2008).** Procédé de bioconservation. In science des aliments. Librairie, Lavoisier. 327-334.
- Gatel, R. (1982).** *L'aliment à l'humidité intermédiaire : concept fondamental et fonction scientifique*. Paris : Ed .APRIA . 39-50.
- Giddey, C. (1982).** *Les produits à humidité intermédiaire : Cas particulier du problème de la conservation des produits à humidité intermédiaire*. Paris : Ed. APRIA.21-28p.
- Girotti-chanu, C. (2006).** *Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de MICRO TEA Debillis*. Thèse de doctorat : Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé. Lyon. 137p.
- Godinho-Ferreira P.G., Azevedo, A.M., Rego F., 2005.** Carta da tipologia florestal de Portugal Continental. *Silva Lusit*, **13**, 1-34.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1220-1234.
- Guillaume, J. (1999).** *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés : Du labo au terrain*. Edition Quae. 229p.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Queiroz, M.J.R.P., Santos-Buelg, C., Ferreira, I.C.F.R. (2013).** Characterization of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, **141**, 3721-3730.
- Guiraud, J.P., Galzy, P. (1980).** *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. Les éditions de l'usine nouvelle. 1-239p.
- Guiraud, J.P. (2003).** *Microbiologie Alimentaire*. Paris: Tec & Doc, Dunod. 90-292p.
- Gulen, T., Bayram, K., Nazan, C., Ahmet, G. (2012).** Free radical scavenging activity and phenolic content of edible wild fruits from Kazdagi (Ida Mountains), Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, **6(36)**, 4992.
- Guo, M., Perez, C., Wei, Y., Rapoza, E., Su, G., Bou-Abdallah, F., Chasteen, N. D. (2007).** Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio- effects. *Dalton Transactions*, **(43)**, 4951-4961.
- Haard, N. (2002).** The role of enzymes in determining seafood color, flavor and texture. In: Safety and quality issues in fish processing H.A. Bremner. Cambridge, UK, Woodhead Publishing in *Food Science and Technology*, 221-254.

- Haddadi, H. (2005).** *Détermination de l'activité antioxydante de quelques fruits.* Mémoire de magister : Université de Béjaïa. 76p.
- Harborne, J. B., Williams, C.A., (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**, 481-504.
- Hässig, A., Schwabl, H., Stampfli, K. (1999).** Flavonoids and tannins: plantbased antioxidants with vitamin character. *Med. Hypotheses*, **52**, 479-481.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujitani, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T., Okuda, T. (1989).** *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2016-2021.
- Hegazy, A.K., Al-Rowaily, S.L., Faisal, M., Alatar, A.A., El-Bana, M.I., Assaeed, A.M. (2013).** Nutritive value and antioxidant activity of some edible wild fruit in the Middle East. *Journal of Medicinal Plant Research*, **7(15)**, 938-946.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13(10)**, 572-584.
- Hellal, Z. (2011).** *Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (Sardina pilchardus).* Mémoire de Magister : Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou, 96p.
- He-Long, B., Jing, W.L., Li L.Chun-Ming. (2010).** *Journal of the Chinese Chemical Society*, **57**, 1071-1076.
- Huberson, M. (2008).** *Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins: modélisation et interprétation métabolique.* Thèse de Doctorat en Génie des Procédés et Environnement : Institut National Polytechnique de Toulouse. 121p.
- Iserin, P., (2001).** *Encyclopédie des Plantes Médicinales; Identification, Préparation, Soins*, Edition Larousse. 170p.
- IUCN. (2005).** A Guide to Medicinal Plants in North Africa. Malaga (Spain): Ed. IUCN. 256 p.
- Jean, L. (2007).** Microbiologie alimentaire .CUQ . 4-6.
- Jeantet, R., Croguennec, T., Schck, P., Brulé, G. (2006).** *Science des aliments. Biochimie-Microbiologie-Procédés-Produits.* Paris : Tec & Doc, Lavoisier. 379p.
- Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Jo, S.C., Nam, K.C., Ahn, D.U., Lee, S.C. (2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels.
- Julkunen-Titto, R. (1985).** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **33**, 213-217.
- Jung, Y.D., Ellis, L.M. (2001).** Inhibition of tumour evasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int. J. Exp. Path.* **82**, 309-316.

- 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.
- Kelen, M., Bektas, T. (2008).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresources technology*, **99**, 4096-4104.
- Kim, T.L. (2012).** In Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants; Springer: Dordrecht. *The Netherlands; Heidelberg, Germany; London, UK; New York, NY, USA*, **2**, 444-451.
- Korsane, N., Klinquart, A., Daude, G. (2004).** Salmonella sp. Dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **148**, 174-193.
- Laguerre, M., López-Giraldo, L. J., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P. (2007).** Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *OCL*, **14 (5)**, 278-292.
- Lamare, R.L., Bidyut C., Deka A., Nath R.K., Patel. (2013).** Dynamics of Physico-Chemical Values in *Sohshang (Elaeagnus latifolia* L.) across Maturity.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., Lee, C.Y. (2003).** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Theas and Red Wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **3**, 7292-7295.
- Le Loir, Y., Gautier, M. (2010).** *Staphylococcus aureus*. *Collection Monographie de microbiologie*. Paris : Tec & Doc, Lavoisier.
- Leonti, M., Nebel, S., Rivera, D., Heinrich, M. (2006).** Wild gathered food plants in the European Mediterranean: a comparison analysis. *Econ. Bot.* **60**, 130- 142.
- Liao, CH., Lai, C. C., Hsu, M.S., Chu, F.Y., Wu, M.Y., Huang, Y.T., Hsueh, P.R. (2010).** Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **35 (5)**, 457-60.
- Lim, Y.Y., Lim, T.T., Tee, J.J. (2007).** Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, **103**, 1003-1008.
- Liu, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H., Zeng, X. (2009).** Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng, *Food Chemistry*, **112**, 35-41.
- Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F. (2006).** "Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86(3)**, 477- 485.

- Male_Év, D. É., Kunti_ç, V. (2007).** Investigation of metal--flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal--flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc*, **72**, 921-939.
- Maleš, Ž., Plazibat, M., undaé, B., Žuntar, I. (2006).** Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree- *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm.* **56**, 245-250.
- Marfak, A. (2003).** *Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec les Radicaux issus des Alcools : Formation de Depsides.* Thèse doctorat : Université de Limoges, Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé, Faculté de Pharmacie. 220p.
- Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. (2005).** Total Phenolics and Total Flavonoids in Bulgarian Fruits and Vegetables. *Journal of University Chemistry and Technology Metallurgy*, **40** (3), 255-260.
- Marouf, A., Joël, R., (2007).** *La botanique de A à Z.* Paris : Dunod. 9-177p.
- Masuoka, N., Matsuda, M., Kubo, I. (2012).** Characterization of the antioxidant activity of flavonoids. *Food chemistry*, **131**(2), 541-545.
- Mendes, L. (2010).** Estudo do efeito protector da folha e fruto da espécie *Arbutus unedo* L. na danificação oxidativa em eritrócitos humanos, Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., Carvalho, P. (2011).** Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chemistry and Toxicology*, **49**, 2285-2291.
- Messaïd, 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. Boumerdés. 74p.
- Miean, K. H., Mohamed, S. (2001).** Flavonoid (myricetin, quercetin, Kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(6), 3106-3112.
- Millan, H., (2004).** *La quercétine et ses dérivés : Molécules caractère pro oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et application thérapeutiques.* Thèse de doctorat : Université de Louis Pasteur, Strasbourg I. 22p.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food Chemistry*, **85**, 231- 237.
- Miraliakbari, H., Shahidi, F. (2008).** Antioxidant activity of minor components of tree nut oils, *Food Chemistry*, **111**, 421- 427.

- Morris, C. J., Earl, J. R., Trenam, C. W., Blake, D. R. (1995). Reactive oxygen species and iron-dangerous partnership in inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 27(2), 109-122.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Arch. Biochem. Biophys*, 385 (1), 13-19.
- Nicol, N., Maudet, M. (2000). Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Dossier : Les vitamines liposolubles, 7 (3), 266-700.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American J. Clinic. Nutr.* 74, 418-425.
- Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro Casal, R.S.A.B., Pereira, J.A. (2011). Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Res. Int.* 44, 1401-1407.
- Ortuno, A., Baidez, A., Gomez, P., Arcas, MC., Porrás, I., Garcia-Lidon, A., Del Rio, J.A. (2006). *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 98 (2), 351-8.
- Osato, M. (2009). Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17 (1), 39-44.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Özcan, M.M., Haciseferoğullari, H. (2007). The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering*, 78, 1022-1028.
- Pallauf, K., Rivas Gonzalo, J.C., del Castillo, M.D., Cano, M.P., de Pascual Teresa, S. (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits: *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 273-281.
- Packer, J. E., Mahood, J. S., Mora-Arellano, V. O., Slater, T. F., Willson, R. L. & Wolfenden, B. S. (1981). Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy-radical with beta-carotene, diphenyl furan and 1, 4-diazobicyclo (2, 2, 2)-octane. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 98, 901-906.
- Pawlowska, A., Leo, M., Brassa, A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) Fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 10234-10238.

- Roux, D., Catier, O. (2007). *Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie*. Wolters Kluwer France Edition. 74p.
- Sarni-Manchado, P. Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. *Collection Sciences et Techniques agroalimentaires*. Tec & Doc, Lavoisier.398P.
- Schwarz, K., Ernst H., Ternes, W. (1996). Evaluation of antioxydative constituents from thyme. *Journal Science of Food and Agriculture*, **77** (2), 217-223.
- Sebnem, S. I., Hakme, H. O., Hulya, Y., Neshhan, E. (2012). Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, **11**(3), 230.
- Serçe, S., Özgen, M., Torun, A.A., Ercisli, S. (2010). Chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* L. (Fam. *Ericaceae*) (the Greek strawberry tree) fruits from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**, 619 - 623.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal Food Microbiology*, **117**, 112-119.
- Shon, M.Y., Kim, TH., Sung, NJ., (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (Phellinus of Hymenochaetaceae) extracts. *Food Chemistry*, **82**, 593-597.
- Shon, M., Lee, J., Choi, J., Choi, S., Nam, S., Seo, K., Lee, S., Sung, N., Park, S. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of *chungkukjang*. *Journal of Food Composition and Analysis*, **20**, 113-118.
- Shrinivas, B., Suresh, RN. (2011). Identification of β -carotene and β -sitosterol in methanolic extract of *Dipteracanthus patulus* (Jacq) nees and their role in antimicrobial and antioxidant activity. *International Journal of Phytomedicine*, **3**, 20.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. *Food Chemistry*, **101**(1), 10-19.
- Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G., & Leitão, M. C. A. (2001). The *Arbutus berry*: Studies on its color and chemical characteristics at two nature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, **14**, 27-35.
- Sokmen, A., Gulluce, M., Askin Akpulat, H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., Sahin, F. (2004). The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, **15**, 627-634.
- Spano, N., Casula, L., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Scanu, R., Tapparo, A., Sanna, G. (2006). ARP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey. *Talanta*. **68**, 1390-1395.

- Speronie, Scartezzini, P., (2000). Review on some plants of indiane traditional medicine with atioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**, 23- 43.
- Su, M.S., Shyu, Y.T., Chien, P.J. (2008). Antioxidant activities of citrus herbal product extracts, *Food Chemistry*, **111**, 892-896.
- Takrouni, M.M., Ali, I.B.H., Messaoued, C., Boussaid, M. (2012). Genetic variability of Tunisian Wild strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) population inferfered from isozyme markers. *Sci. Hort*, **146**, 92-98.
- Tardío, J., Pardo-de-Santayana, M., Morales, R. (2006). Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain, *Bot. J. Linn. Soc.* **152**, 27-71.
- Tonelli, N., Gallouin, F. (2013). *Des fruits et des grains comestibles du monde entier*. 87-91.
- Torres, J.A., Valle, F., Pinto, C., Garcia-Fuentes, A., Salazar, C., Cano, E. (2002). *Arbutus unedo L.* communities in southern Iberian Peninsula mounatains. *Plant Ecol.* **160**, 207-223.
- Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Hollman, P., Chamalides, C., Foufa E., Kaloudis, T., Kromhout, D., Miskaki, P., Petrochilou, I., Poulima, E., Stafilakis, K., Theophilou, D. (2000). Nutritional composition and flavonoid content of edible wild green pies : A potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Journal of Food Chemistry*, **70**, 319-323.
- Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jak_bkiewicz-Banecka, J., W_Âgrzyn G. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, **62**, 132-135.
- Urban, Th. et al, (1995). Oxydants et antioxydants : effets biologiques et perspectives thérapeuthiques. *Ann. Chir*, **49 (5)**, 427-434.
- Van Acker, S., Tromp, M., Haenen, G.R.M.M., Van Der Vijgh, W., Bast, A., (1995). Flavonoïds as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **214**, 755-759.
- Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D.J., Tromp, M. I. N. J. L., Griffioen, D. s. e. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoïds. *Free Radical Biology and Medicine*, **20(3)**, 331-342.
- Vincenot, F., Saleh, M., Prevost, G. (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*, **407**, 61-69.
- Vitale, D. (2012). La macchia a corbezzolo (*Arbutus unedo L.*, *Ericaceae*): aspetti botanici, prodotti e potenzialità economiche in Sardegna Tesi di dottorato di ricerca in: *Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo*. Università degli Studi di Sassari.73p.

- Wang, D., Tang, W., Yang, G.M., et Cai, B.C. (2010).** "Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge." *Chinese Journal of Natural Medicines*, **8(6)**, 461-465.
- Woodman, O.L., Meeker, W.F., Boujaoude, M. (2005).** Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **46**, 302-309.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, **64 (4)**, 555– 559.

Annexes

Annexe I : Courbes d'étalonnage

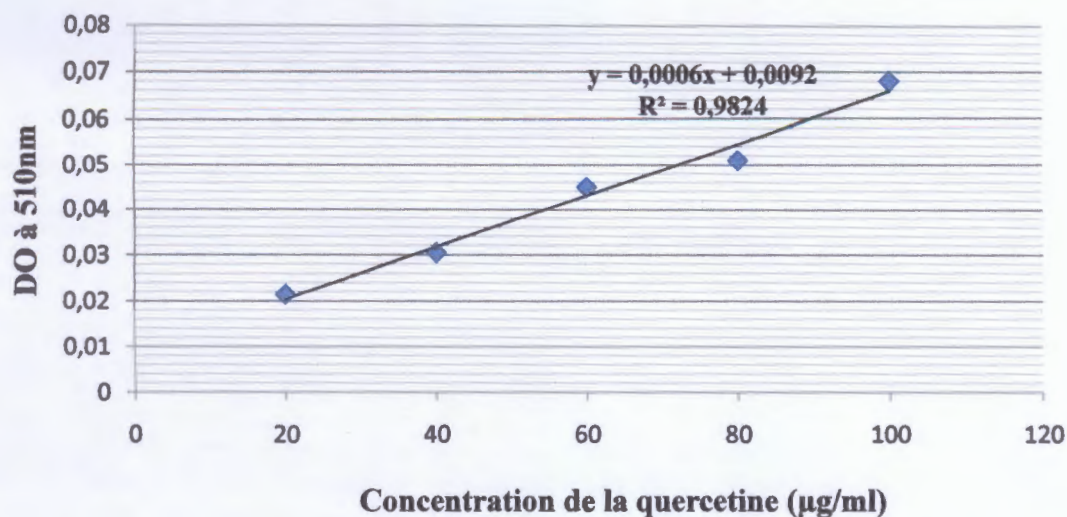


Figure 01. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux

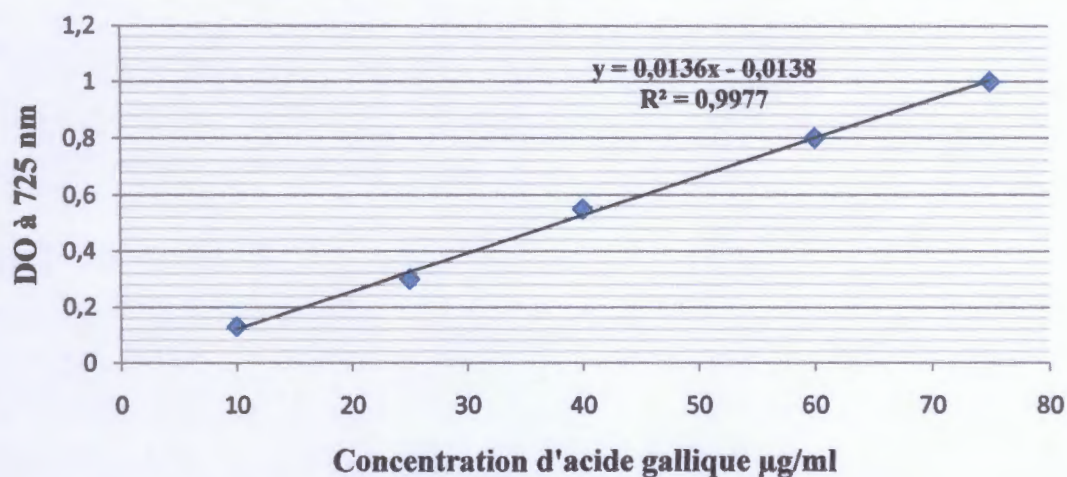


Figure 02. Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins totaux

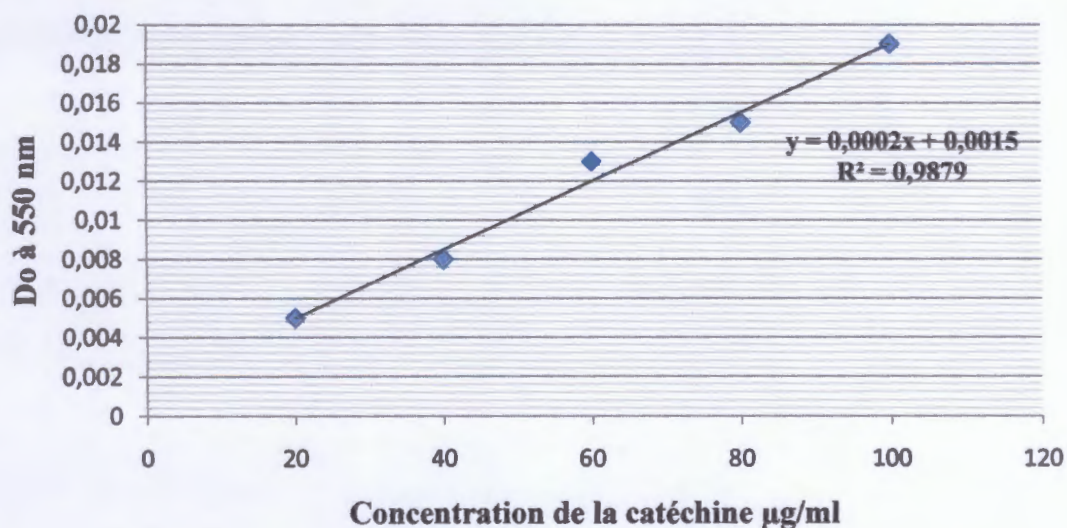


Figure 03. Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins condensés

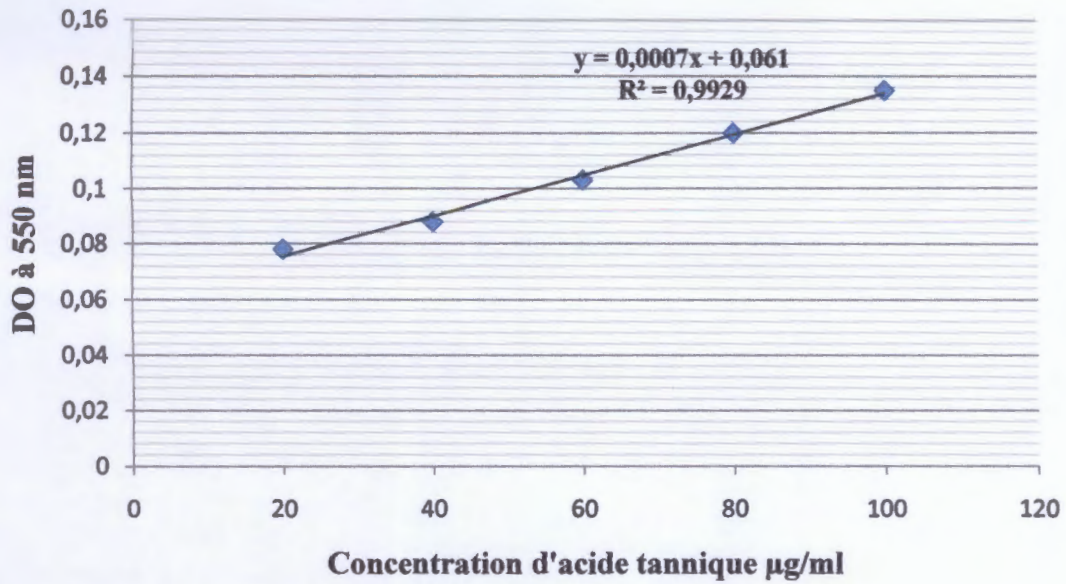


Figure 04. Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins hydrolysables.

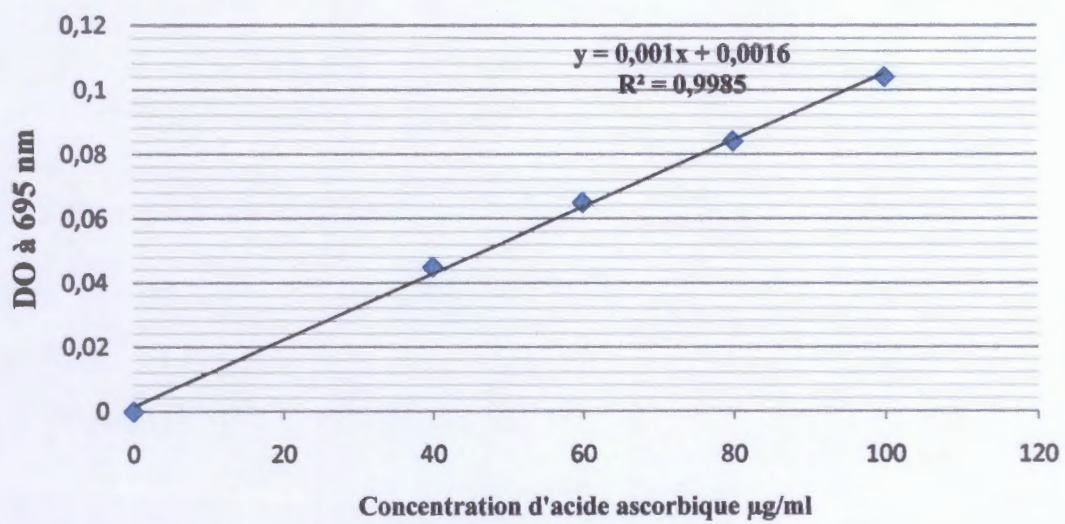


Figure 04. Courbe d'étalonnage pour l'évaluation de l'activité antioxydante totale.

Annexe II : La table de Mc Farland

Mc Farland standard	0.5	1	2	3	4
1% Chloride de barium (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1% Acide sulfurique (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Densité des cellules approx 1x 10 ⁸ UFC / ml	1.5	3	6	9	12
Transmittance* %	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance	0.08 à 0.1	0.257	0.451	0.582	0.669

* à la longueur d'onde 600 nm

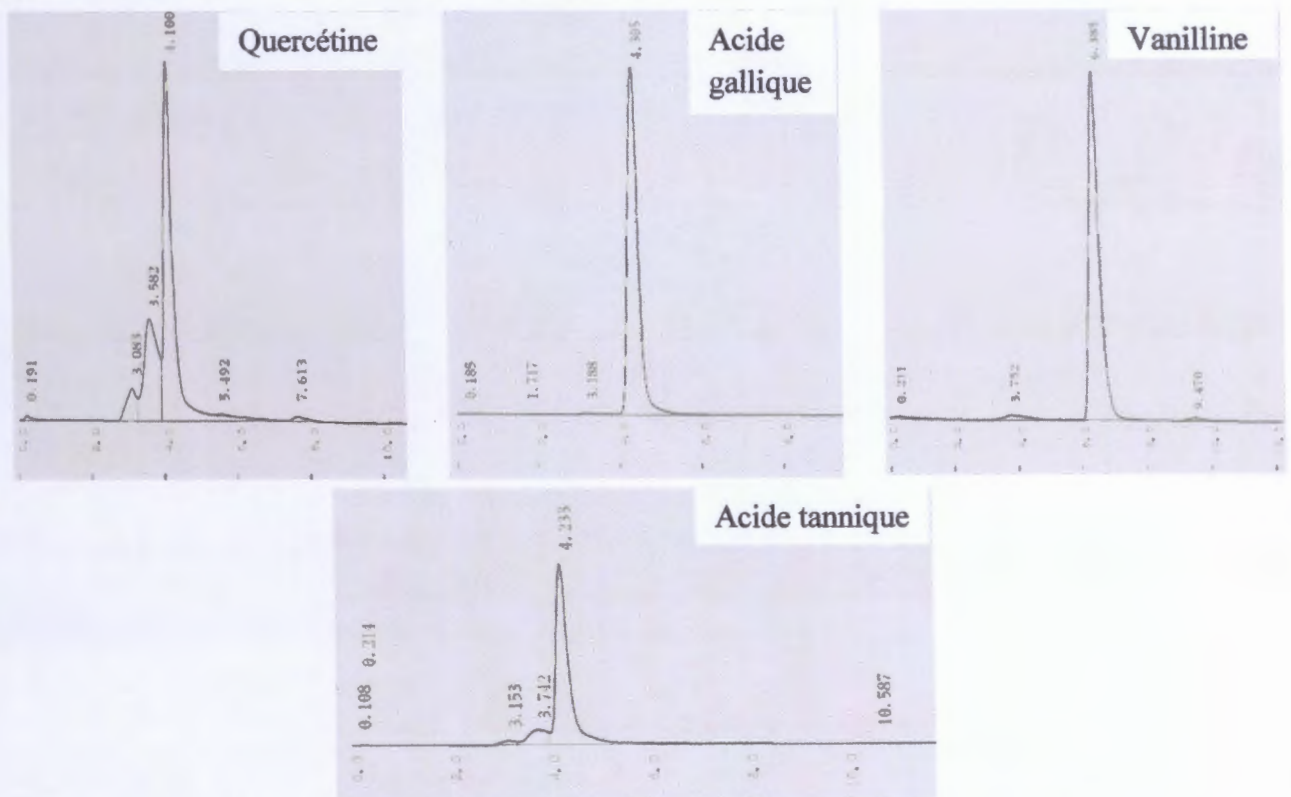
Annexe III : Analyse par HPLC

Figure 1: Chromatogrammes des différents standards testés par l'HPLC.

Tableau 01 : Temps de rétention des standards testés par l'HPLC.

Standards	Temps de rétention (Tr) min
Quercétine	4.100
Acide tannique	3.742
Acide gallique	4.305
Vanilline	6.385

Annexe IV: Les résultats des paramètres étudiés

Tableau 01. Résultats de détermination des paramètres morphologiques du fruit d'*Arbutus unedo* L. aux trois stades de maturation.

Paramètres	Fruit vert	Fruit jaune	Fruit rouge
Poids de fruit entier (g)	2.1 / 3.2 / 05	03 / 5.1 / 4.4	4.3 / 5.5 / 3.2
Moyenne	3.43±1.46	4.16±1.069	4.33±1.15
Longueur de fruit (cm)	1.7 / 02 / 1.7	1.4 / 1.5 / 2.3	2.7 / 2.1 / 1.9
Moyenne	1.8±0.17	1.73±0.49	2.23±0.41
Largeur de fruit (cm)	1.7 / 2.2 / 02	1.4 / 1.5 / 02	2.1 / 1.9 / 2.2
Moyenne	1.96±0.25	1.63±0.32	2.06±0.15
Ratio : longueur/largeur	0.91±0.11	1.06±0.07	1.08±0.12

Tableau 02. Résultats du pH des fruits d'*Arbutus unedo* L. de trois stades de maturation.

	Vert	Jaune	Rouge
Echantillon 1	3.50	3.70	4.00
Echantillon 2	3.52	3.71	4.10
Echantillon 3	3.53	3.70	4.00
Moyenne	3.51±0.015	3.70±0.005	4.03±0.057

Tableau 03. Rendement des extraits de fruit d'*Arbutus unedo* L.

	Tannins	Flavonoïdes	Caroténoïdes
Poids de ballon vide (g)	164.9	165	160.3
Poids de ballon + Echantillon (g)	165.74	168.4	161.13
L'extrait sec Résultant (g)	0.84	3.4	0.83

Tableau 04. Résultats du dosage des flavonoïdes de fruit rouge d'*Arbutus unedo* L.

	Echantillon 01	Echantillon 02	Moyenne
DO (nm)	0.05	0.051	0.0505±0.0007

Tableau 05. Résultats de dosage des caroténoïdes du fruit rouge d'*Arbutus unedo* L.

Absorbance à 450 nm	Teneur en caroténoïdes µg /g
0.082	10.94

Tableau 06. Résultats du dosage des tannins totaux, condensés et hydrolysables du fruit vert d'*Arbutus unedo* L. (nm)

	Echantillon1	Echantillon 2	Moyenne
Tannins totaux	0.589	0.601	0.595±0.008
Tannins condensés	0.004	0.009	0.006±0.003
Tannins hydrolysables	0.062	0.067	0.064±0.003

Tableau 07. Résultats d'activité antioxydante totale des trois extraits du fruit d'*Arbutus unedo* L. (nm).

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Moyenne
Tannins	0.096	0.097		0.0965±0.0007
Flavonoïdes	0.02	0.019	0.019	0.0193±0.0005
Caroténoïdes	0.03	0.04		0.035±0.007

Tableau 08. Résultats de réduction de fer des trois extraits d'*Arbutus unedo* L.

	0.2mg/ml		0.4mg/ml		0.6mg/ml		0.8mg/ml	
Flavonoïdes	0.047	0.047	0.062	0.06	0.07	0.082	0.236	0.237
Moyenne (nm)	0.047±00		0.061±0.001		0.076±0.008		0.2365±0.007	
Caroténoïdes	0.009	0.009	0.143	0.143	0.221	0.18	0.285	0.285
Moyenne (nm)	0.009±00		0.143±00		0.2005±0.028		0.285±00	
Tannins	0.043	0.05	0.247	0.242	0.391	0.300	0.405	0.406
Moyenne (nm)	0.0465±0.004		0.2445±0.003		0.3455±0.064		0.4055±0.0007	
Acide ascorbique (nm)	0.811		2.342		2.38		2.44	

Tableau 9. Les résultats du blanchissement du β -carotène des trois extraits d'*Arbutus unedo* L.

	0.2mg/ml		0.4mg/ml		0.6mg/ml		0.8mg/ml	
Flavonoïdes	0.06	0.068	0.066	0.066	0.07	0.074	0.078	0.08
Moyenne (nm)	0.064±0.005		0.066±0.00		0.072±0.002		0.079±0.001	
Caroténoïdes	0.047	0.043	0.059	0.06	0.072	0.075	0.099	0.08
Moyenne (nm)	0.045±0.002		0.0595±0.0007		0.0735±0.002		0.089±0.013	
Tannins	0.028	0.03	0.051	0.054	0.078	0.08	0.082	0.08
Moyenne (nm)	0.029±0.001		0.0525±0.002		0.079±0.001		0.081±0.001	
BHT (nm)	0.1055		0.1945		0.21		0.2485	

Tableau 10. Résultats du piégeage de peroxyde d'hydrogène des trois extraits d'*Arbutus unedo* L.

Le contrôle = 1.95 nm

	0.2mg/ml		0.4mg/ml		0.6mg/ml		0.8mg/ml	
Flavonoïdes	0.361	0.414	0.339	0.34	0.254	0.259	0.133	0.137
Moyenne (nm)	0.387±0.037		0.3395±0.0007		0.256±0.003		0.135±0.002	
Caroténoïdes	0.507	0.515	0.304	0.478	0.305	0.3	0.29	0.278
Moyenne (nm)	0.511±0.005		0.391±0.123		0.3025±0.003		0.284±0.008	
Tannins	0.396	0.38	0.321	0.326	0.318	0.319	0.133	0.156
Moyenne (nm)	0.388±0.011		0.323±0.003		0.3185±0.0007		0.144±0.016	
Acide ascorbique (nm)	0.51		0.472		0.405		0.323	

Tableau 11. Résultats de la variation du pH au cours de conservation.

	Jour 03	Jour 06	Jour 09	Jour 12	Jour 15
Flavonoïdes	6.43 / 6.48	6.67 / 6.68	6.66 / 6.90	6.86 / 6.80	7.1 / 7.0
Moyenne	6.45±0.03	6.675±0.007	6.78±0.16	6.83±0.04	7.05±0.07
Caroténoïdes	6.49 / 6.40	6.68 / 6.62	7.01 / 6.70	7.06 / 6.88	7.24 / 7.09
Moyenne	6.44±0.06	6.65±0.04	6.85±0.21	6.97±0.12	7.16±0.10
Tannins	6.49 / 6.65	6.55 / 6.60	7.04 / 6.75	7.04 / 6.79	6.94 / 6.93
Moyenne	6.57±0.11	6.57±0.03	6.89±0.20	6.91±0.17	6.93±0.007
Témoin	6.64	6.89	07	07	7.10

Tableau 12. Résultats de la variation du nombre de *Staphylococcus aureus* au cours de conservation. (UFC / g).

	Jour 03	Jour 06	Jour 09	Jour 12	Jour 15
Flavonoïdes	42 /43	18 / 10	17 / 16	11 / 09	01 / 09
Flavonoïdes	57/40	29/ 32	14/ 21	16/06	12/13
Moyenne	45±7.75	23±10.14	17±2.94	11±4.20	09±5.43
Caroténoïdes	50 /47	34 / 30	38 /47	32 / 40	30 /40
Caroténoïdes	43/33	22/29	36/23	20/36	09/21
Moyenne	43±7.41	29±4.99	36±9.89	32±8.64	25±13.19
Tannins	40/57	29 /33	21/ 20	19/18	14 /12
Tannins	41/30	30/26	23/13	22/19	06/06
Moyenne	42±11.16	30±2.88	19±4.34	18±1.73	10±4.12
Témoin	127	147	182	190	180
Témoin	120	138	180	174	181
Moyenne	124±4.94	143±6.36	181±11.41	182±11.31	182±0.70

Présenté par: M^{elle} OUALI Chahinez
M^{elle} MERIBAI Khadidja

Encadreur : Dr Idoui T.

Date de soutenance : 27/06/2016

La bioconservation des poissons par l'ajout d'extrait du fruit d'*Arbutus unedo L.*: Evaluation de la qualité au cours du stockage réfrigéré

Nature du diplôme : Master en Biologie : Option Contrôle de Qualité des produits alimentaire

Résumé

Ce travail vise à la valorisation d'«*Arbutus unedo L.*» par l'étude de l'effet antioxydant et antimicrobien de ses composés phénoliques. Les extraits phénoliques ont été appliqués sur la sardine commune pour prévenir, ainsi sa dégradation.

L'extraction des polyphénols (tannins, caroténoïdes, flavonoïdes) a été effectuée par une méthode conventionnelle (macération) en utilisant des solvants (acétate d'éthyle, acétone, méthanol).

Les résultats obtenus montrent que les extraits flavonoïdique et tannique exercent une forte activité antioxydante et antimicrobienne par rapport à celles des caroténoïdes, de ce fait ils peuvent être utilisés comme bioconservateur. L'*Arbutus unedo L.* est considéré comme source importante d'antioxydants naturels.

Mots clés : *Arbutus unedo L.*, activité antioxydante, activité antibactérienne, *Sardina pichardus*, bioconservation.

Abstract

This work aims to the valorization of «*Arbutus unedo L.* » by the study of the antioxydant and antimicrobial effect of its phenolic compounds. The phenolic extracts were applied to common sardine to prevent, thus its degradation.

The extraction of the polyphenols (tannins, carotenoids, flavonoïds) was carried out by a conventional method (maceration) by using solvents (acetate of ethyl, acetone, methanol).

The results obtained show that the extract flavonoïdic and tannic carry on a strong antioxydant and antimicrobial activity by contribution with those of carotenoids, of this fact it can be used as bioconservator. *Arbutus unedo L.* is regarded as significant source of natural antioxydants.

Key words: *Arbutus unedo L.*, antioxidant activity, antibacterial activity, *Sardina pichardus*, bioconservation

يتركز هذا العمل على إبراز قيمة «قطلب أونيدو» من طريق دراسة مفعول مركباته الفينولية المضادة للأكسدة والميكروبات وتطبيقها في وقاية السردين الشائع من الفساد. تم استخراج المستخلصات الفينولية (تانيينات, كاروتينويدات, فلافونويدات) بطريقة النقع باستعمال مذيبات (اسيطات ايثيل, الاسيتون, الميثانول). تظهر النتائج المتحصل عليها أن المستخلصين الفلافونويدي و التانيني يمارسان مفعول قوي مضاد للأكسدة و للميكروبات بمقارنتهما مع مفعول الكاروتينويدات, بهذا الفعل يستطاع استعمالهما مثل حافظ حيوي. يعتبر «قطلب أونيدو» مصدر حيوي مهم لمضادات الأكسدة.

الكلمات الدالة : قطلب أونيدو, الفعل المضاد للأكسدة, الفعل المضاد للبكتيريا, السردين الشائع, الخط الحيوي