

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 Seddik Ben Yahia - 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
وعلوم التغذية

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 2.3.5.3.....

Mémoire de fin d'études

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

Option : Contrôle de Qualité des Produits Alimentaires

Thème

**La bioconservation du beurre traditionnel « IGILAIT » par ajout
d'extrait de fruit d'*Arbutus unedo* L. : Evaluation de la qualité
physicochimique au cours du stockage réfrigéré**

Membres de Jury :

Présidente : M^{elle}. Bourad Dalila

Examinatrice : M^{me}. Bouchefra Amina

Encadrant : D^r. Idoui Tayeb

Co-Encadrante : M^{me}. Bouhanna Imen

Présenté par :

Boumaza Chahrazed

Khaldi Widad

Melle Bourad.D

Année Universitaire 2015-2016

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

REMERCIEMENTS

Nous remercions, en premier lieu, Allah le tout puissant de nous avoir donné la volonté et la patience pour mener à bien ce modeste travail.

*Nous aimerions exprimer nos vifs remerciements à notre promoteur **Dr. Idoui Teyeb** maitre de conférence à l'université de Jijel et à notre sous-*

*Promotrice **Mme. Bouhanna Imen***

pour leurs appui, leurs orientation et ses conseils qui nous ont été très précieux.

*Nous tenons à remercier également **Mlle. Bourad Dalila** et **Mme. Bouchebra Amina** pour l'honneur qu'elles nous font en acceptant de juger et d'évaluer notre travail.*

Nous adressons nos chaleureux remerciements à l'ensemble des enseignants du département qui ont contribué à notre formation et particulièrement

***Mr. Khennouf** et **Mr. Boudjellal**.*

*Tous nos remerciements vont à nos ingénieurs du laboratoire de contrôle de qualité : la responsable **Soumia, Nassifa, Salima, Asma, Madjeda** et **Mokhtar** pour leur soutien et leurs encouragements.*

Enfin, à tous ce qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire merci.

Khaldi Widad** et **Boumaza Chahrazed



Dédicaces

*Avec l'aide du tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je
dédie :*

A ma très chère maman : « Hassina »,

Qu'ALLAH la protège pour moi, je ne pourrai jamais la remercier assez

Pour ce qu'elle fait pour moi.

A mon très cher père : « Abd-El-Aziz »,

*Je voudrais partager ce succès avec lui, Qu'ALLAH le protège et le
garde.*

A mes frangins : « Mouhammed », « Omar », « Mokhtar », « Yassmina »,

« Naïma », « Amin ».

Qui sont très présents pour me soutenir

A mes chers amies et amis.

Widad

Dédicaces

*Avec l'aide du tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je
dédie :*

A ma très chère maman : « Fatima »,

Qu'ALLAH la protège pour moi, je ne pourrai jamais la remercier assez

Pour ce qu'elle fait pour moi.

A mon très cher père : « Aoumar »,

*Je voudrais partager ce succès avec lui, Qu'ALLAH le protège et le
garde.*

A mes frangins : « Saliha », « Soumia », « Fayssal », « Samira »,

« Samir », « Rafika », « Tahar », « Yasser ».

Qui sont très présents pour me soutenir

A mes chers amies et amis.

Chahrazed

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Introduction	01
Synthèse Bibliographique	
Chapitre I : Caractéristiques d'<i>Arbutus unedo</i> L.	
I.1. Etymologie et dénomination d' <i>Arbutus unedo</i> L.	03
I.2. Place dans la systématique.....	03
I.3. Description botanique.....	04
I.3.1. L'arbre.....	04
I.3.2. Les feuilles et fleurs.....	04
I.3.3. Les fruits	05
I.4. Répartition géographique.....	05
I.5. Utilisation alimentaire.....	06
I.6. Les composés antioxydants de fruit.....	07
I.7. Application des antioxydants dans le domaine alimentaire.....	10
Chapitre II : plan d'expériences	
II.1. Définition et données.....	11
II.2. Terminologie.....	11
II.2.1. Notion d'espace expérimental	11
II.2.2. Notion de surface de réponse	12
II.2.3. Notions de statistique appliquées aux plans d'expériences.....	13
II.2.3.1. Equation mathématique.....	13
II.2.3.2. Désirabilité.....	13
II.2.3.3. Analyse de la variance et Coefficient de détermination (R^2).....	13
II.2.3.4. P-value.....	13
II.3. Types de plans d'expériences selon l'objectif recherché.....	14
II.3.1. Les plans de criblage.....	14
II.3.2. Les plans de modélisation.....	14
II.3.3. Les plans de mélange.....	14
II.4. Plans pour Surfaces de Réponse.....	14

II.4.1. Le plan composite central (CCD : central composite design).....	15
---	----

Etude Expérimentale

II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel.....	17
II.1.1. Matériel végétal.....	17
II.1.1.1. Fruit d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	17
II.1.2. Matériel biologique	17
II.1.2.1. Beurre commercial « IGILAIT »	17
II.1.3. Les produits chimiques et réactifs	18
II.1.4. Appareillage	18
II.2. Méthodes.....	18
II.2.1. Préparation de la poudre des échantillons.....	18
II.2.2. Choix de meilleur solvant d'optimisation.....	19
II.2.2.1. Préparation des extraits bruts secs.....	19
II.2.2.2. Détermination de l'activité antioxydante totale (TAC)	19
II.2.3. Optimisation de l'extraction des substances bioactives par la méthodologie de surface de réponse (CCD à précision uniforme).....	19
II.2.4. Préparation d'extrait brut sec	20
II.2.5. Détermination de la teneur en polyphénols totaux	20
II.2.5.1. Dosage des phénols totaux	21
II.2.5.2. Dosage des flavonoïdes.....	21
II.2.6. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits	21
II.2.6.1. Activité antioxydante totale (TAC)	21
II.2.6.2. Piégeage du radical libre DPPH [•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	22
II.2.7. Analyse statistique des résultats	22
II.2.8. Analyse qualitative par HPLC.....	23
II.2.9. Utilisation de l'extrait optimal dans le processus de la conservation.....	23
II.2.9.1. Préparation de l'extrait.....	23
II.2.9.2. Essai de conservation du beurre par l'extrait de fruit	23
II.2.9.3. Analyses physicochimiques du beurre pendant la conservation.....	23
II.2.9.3.1. Détermination de l'acidité.....	23
II.2.9.3.2. Indice de peroxyde	24
II.2.9.3.3. Indice de saponification	24
II.2.9.3.4. Indice d'acide	25

II.2.9.3.5. Détermination du pH.....	25
II.2.9.4. Analyse statistique des résultats	25

III. Résultats et Discussion

III. Préparation des extraits bruts secs.....	26
III.1. Sélection du meilleur solvant pour l'optimisation de l'extraction des substances antioxydantes.....	26
III.2. Optimisation de l'extraction des substances bioactives par la méthodologie surface de réponse type CCD précision uniforme	27
III. 2.1. Constitution de la matrice d'expérience.....	27
III.2.2. Résultats de l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux.....	28
III.2.2.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	29
III.2.2.2. L'analyse de l'influence et de l'interaction des facteurs.....	29
III.2.2.3. Validation du modèle.....	34
III.2.3. Résultats de l'optimisation de l'extraction de l'activité antioxydante totale.....	34
III.2.3.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	34
III.2.3.2. L'analyse de l'influence et de l'interaction des facteurs.....	35
III.2.3.3. Validation du modèle.....	39
III.2.4. Résultats de l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes.....	39
III.2.4.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	39
III.2.4.2. L'analyse de l'influence et de l'interaction des facteurs.....	40
III.2.4.3. Validation du modèle.....	45
III.2.5. Résultats de l'optimisation de la réduction du DPPH.....	45
III.2.5.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	45
III.2.5.2. L'analyse de l'influence et de l'interaction des facteurs.....	45
III.2.5.3. Validation du modèle.....	50
III.3. Effet de différents facteurs sur les réponses étudiées.....	50
III.3.1. Effet de la température	50
III.3.2. Effet du temps.....	51
III.3.3. Effet de la concentration du solvant.....	51
III.3.4. Effet du rapport liquide/solide.....	52
III.4. Identification des antioxydants par HPLC	53
III. 5. Utilisation d'extrait optimal dans le processus de la conservation du beurre.....	53

III.5.1. Analyses physicochimiques du beurre pendant la bioconservation.....	54
III.5.1.1. Détermination de l'acidité.....	54
III.5.1.2. Détermination de l'indice d'acide.....	55
III.5.1.3. Détermination de l'indice de peroxyde.....	56
III.5.1.4. Détermination de l'indice de saponification	57
III.5.1.5. Détermination du pH	58
Conclusion et perspectives	60
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

°C :	Degré Celsius
µL :	Microlitre
-1 :	Niveau bas
+1 :	Niveau haut
3D :	Trois dimensions
A% :	Acidité
AFNOR :	Association française de normalisation
ANOVA :	Analyze of variance
CCD :	Central composite design
Con :	Concentration
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
EAA :	Equivalent acide ascorbique
EAG :	Equivalent acide gallique
EQ :	Equivalent quercitine
FT :	Flavonoïdes
GC-MS :	Chromatographie phase gazeuse couplé par spectrophotomètre de masse
HPLC :	High performance liquid chromatography
I% :	Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).
L/S :	Ratio liquide/solide
Meq de KOH/g :	milliéquivalents de potasse alcoolique/gramme
Meq d'O₂/ Kg :	milliéquivalents d'oxygène actif /kilogramme
P :	Probabilité ou risque de commettre une erreur
pH :	potentiel d'hydrogène
PPT :	Polyphénols totaux
R :	Coefficient de corrélation
RSM :	Response surface methodology
R² :	Coefficient de détermination
TAC :	Total antioxydant capacity
X1 :	Température
X2 :	Temps d'extraction
X3 :	Concentration de solvant
X4 :	Ratio liquide/Solide

Liste des figures

Figure 01 : Distribution approximative d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	06
Figure 02 : Les composés d'antioxydant présentent dans l'arbre <i>Arbutus unedo</i> L.	09
Figure 03 : Domaine de variation d'un facteur.....	12
Figure 04 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse.....	12
Figure 05 : Plan composite centré pour l'étude de deux facteurs.....	16
Figure 06 : Corrélation entre Temps et Température pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	31
Figure 07 : Corrélation entre Concentration et Température pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a):Surface de réponse (b): contour profiler.....	31
Figure 08 : Corrélation entre rapport L/S et Température pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	32
Figure 09 : Corrélation entre Temps et Concentration pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	32
Figure 10 : Corrélation entre Temps et rapport L/S pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	33
Figure 11 : Corrélation entre Concentration et rapport L/S pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	33
Figure 12 : Corrélation entre Temps et Température pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	36
Figure 13 : Corrélation entre Concentration et Température pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	36
Figure 14 : Corrélation entre rapport L/S et Température pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a):Surface de réponse (b): contour profiler.....	37
Figure 15 : Corrélation entre Temps et Concentration pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.	37
Figure 16 : Corrélation entre Temps et rapport L/S pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.	38
Figure 17 : Corrélation entre Concentration et rapport L/S pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.	38
Figure 18 : Corrélation entre Temps et Température pour le taux des flavonoïdes. (mgEQ/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.	41
Figure 19 : Corrélation entre Concentration et Température pour le taux des flavonoïdes	

(mgEQ/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.	42
Figure 20 : Corrélation entre rapport L/S et Température pour le taux des flavonoïdes (mgEQ/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.	42
Figure 21 : Corrélation entre Temps et Concentration pour le taux des flavonoïdes (mgEQ/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.	43
Figure 22 : Corrélation entre Temps et rapport L/S pour le taux des flavonoïdes (mgEQ/gMS). (a):Surface de réponse (b): contour profiler.....	43
Figure 23 : Corrélation entre Concentration et rapport L/S pour le taux des flavonoïdes (mgEQ/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	44
Figure 24 : Corrélation entre Temps et Température pour la réduction du DPPH. (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	47
Figure 25 : Corrélation entre Concentration et Température pour la réduction du DPPH. (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	47
Figure 26 : Corrélation entre rapport L/S et Température pour la réduction du DPPH. (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	48
Figure 27 : Corrélation entre Temps et Concentration pour la réduction du DPPH. (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	48
Figure 28 : Corrélation entre Temps et rapport L/S pour la réduction du DPPH. (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	49
Figure 29 : Corrélation entre Concentration et rapport L/S pour la réduction du DPPH. (a): Surface de réponse (b): contour profiler.....	49
Figure 30 : Chromatogramme de l'extrait optimal des fruits rouges analysé par l'HPLC.....	53
Figure 31 : Variation de l'acidité du beurre au cours du stockage réfrigéré pendant 15 jours.....	54
Figure 32 : Variation de l'indice d'acide du beurre au cours du stockage réfrigéré	55
Figure 33 : Variation de l'indice de peroxyde du beurre au cours du stockage réfrigéré.....	56
Figure 34 : Variation de l'indice de saponification du beurre au cours du stockage réfrigéré.....	57
Figure 35 : Variation du pH du beurre au cours du stockage réfrigéré.....	58

Liste des photos

Photo 01 : Aspect de l'arbre d' <i>Arbutus unedo</i> L.	04
Photo 02 : Aspect des feuilles et fleurs d'arbousier.....	05
Photo 03 : Fruits d'arbousier.....	05
Photo 04 : Les baies mures d'arbose à l'état congelé.....	17
Photo 05 : Beurre « IGILAIT » utilisé pour la bioconservation.....	17
Photo 06 : Poudre de fruit mure d' <i>Arbutus unedo</i> L.	19

Introduction

Introduction

Les plantes comestibles sauvages ou semi-sauvages ont été importantes pour la plupart des cultures humaines et en particulier dans la région méditerranéenne, apportant une contribution importante à la santé des communautés locales. Ils contiennent souvent la plus grande quantité de nutriments et de composés bioactifs que de nombreuses espèces cultivées (Ruiz-Rodríguez, 2011).

Arbutus unedo L., également connu sous le nom arbousier, est une plante méditerranéenne appartenant à la famille des éricacées. L'*Arbutus unedo* L. a une valeur médicinale et nutritionnelle très importante; diverses études ont démontré l'association de la consommation de ces fruits avec un risque réduit de développer certaines maladies telles que l'hypertension, diabète, l'athérosclérose et la thrombose et ils sont utilisés en médecine traditionnelle comme antiseptiques, diurétiques et des laxatifs (Doukkani et Tabac, 2014 ; Fonseca et al., 2015).

De nombreuses études ont été faites sur les fruits d'*Arbutus unedo* L. et sont destinés à déterminer la valeur nutritive et à la recherche d'effets antioxydants et antimicrobiens. Les antioxydants naturels d'*Arbutus unedo* mettent en évidence l'importance de ce fruit comme source naturelle de composés bioactifs (Doukkani et Tabac, 2014 ; Mosele et al., 2016).

Le large éventail d'antioxydants dans les fruits d'arbousier tels que les composés phénoliques (les anthocyanes, les dérivés de l'acide gallique et des tanins), la vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes, suggérer une valeur potentiellement élevée comme un « aliment de promotion de la santé ». Toutefois, la signification biologique de celles-ci *in vitro* a détecté des propriétés antioxydantes qui reste à déterminer (Fortalezas et al., 2010).

L'activité antioxydante de différentes plantes est connue depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. La valorisation de ces plantes passe inévitablement par l'extraction et l'étude des caractéristiques physico-chimiques de leurs extraits. Ces dernières sont des produits à forte valeur ajoutée, et sont utilisées dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques.

Dans l'optique de la recherche des composés bioactifs des fruits d'*Arbutus unedo* L. et vu la complexité et la variabilité des compositions et des propriétés des matrices végétales, un protocole universel d'extraction de ces substances n'existe pas, d'où la nécessité d'une étape d'optimisation. L'optimisation d'extraction des composés bioactifs s'opère par la méthode du plan d'expérience qui traite plusieurs facteurs à la fois et met en évidence les différentes interactions possibles entre les paramètres.

La méthodologie de surface de réponse peut prendre en compte « l'interdépendance possible entre les variables de test tout en minimisant le nombre d'expériences ». Ainsi, il est un outil puissant qui peut fournir des conditions optimales pour améliorer un processus (**Chan et al., 2009**).

Le beurre est un aliment énergétique, fragile et altérable par la chaleur, ou par d'autres facteurs capables de nuire à sa qualité physicochimique, microbiologie et organoleptique. Donc, il est primordial d'assurer sa conservation dans les meilleures conditions possibles (**Makhloufi, 2013**).

La lutte contre l'oxydation des denrées alimentaires au cours de leurs transformations technologiques, du stockage et de la distribution s'impose. Parmi les diverses solutions technologiques possibles, l'addition d'agents antioxydants aux aliments riches en lipides, est pratiquée depuis longtemps. Toutefois, les antioxydants synthétiques comme le butyl-hydroxytoluène (BHT) et butyl-hydroxyanisole (BHA) ont des effets négatifs sur la santé humaine et sont facilement volatiles à haute température ; l'ampleur de ce problème a fait que des antioxydants naturels deviennent de plus en plus recommandés pour remplacer les antioxydants synthétiques (**Gertz, 2000 ; Farag et al., 2003**).

Arbutus unedo L. fait partie de la gamme des plantes médicinales algériennes. Cependant, il est mal exploité et peu connu de point de vue nutritionnel et industriel par la population Algérienne dont sa consommation reste saisonnière (**Bakchiche et al., 2014**).

Dans ce contexte, ce travail s'intéresse à l'extraction des composés bioactifs de fruit d'*Arbutus unedo* L. après une optimisation par la méthodologie de surface de réponse puis l'exploitation d'extrait optimal dans la conservation du beurre traditionnel.

Hormis l'introduction et la conclusion, Le présent travail est scindé en trois parties : une partie bibliographique, une autre expérimentale avec des résultats et une discussion.

Synthèse
Bibliographique

Chapitre I

*Caractéristiques
d'Arbutus unedo L.*

I.1. Etymologie et dénomination d'*Arbutus unedo* L.

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 (Tonelli et Gallouin, 2013).

Unedo en latin signifie également arbousier et arboise ; unedo viendrait de unus, un, et edo, manger, soit unu et dendi : je ne mange qu'un fruit et pas d'avantage car il vaut mieux pour la vue que pour le goût (Tonelli et Gallouin, 2013).

Ce fruit est connus sous plusieurs noms vernaculaire « arbre à fraise », en Algérie s'appelle Ticisnou ou bien Lendj, dans les pays Européens méridionaux ; ervedeiro, medronheiro en Portugal, albocera, alborocera, borrachin, madroñera, madroño en Espagne, corbezzolo, peloso de sorbo en Italie et koumaria en Grèce (Lim, 2012).

I.2. Place dans la systématique

Selon les classifications botaniques, la position taxonomique d'*Arbutus unedo* L. est représentée dans le tableau 1.

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

Rang taxonomique	Signification
Règne	Plantae
sous-règne	Tracheobionta (Plante vasculaire)
Embranchement	Spermaphytes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnolopsida (Dicotylédones)
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Ericales
Sous-ordre	Ericanae
famille	Ericaceae
Sous-famille	Arbutoideae
Genre	<i>Arbutus</i>
Espèce	<i>Arbutus unedo</i> L.

I.3. Description botanique

I.3.1. L'arbre

L'arbousier est un petit arbre (5 à 10 m de hauteur) au tronc court et arbuste ou un arbuste touffu et très rameux (Photo 01). Sa ramure souple lui confère une silhouette arrondie. L'écorce des branches est brun-rouge et, avec l'âge, elle s'écaille et part en lambeaux rubanés ; les jeunes pousses rougeâtres et poilues ont un aspect velouté. L'arbousier a un enracinement profond de type pivotant (il s'insinue souvent dans les éboulis et les roches faillées), il croît lentement mais peut devenir pluri centenaire (Tonelli et Gallouin, 2013).

En automne, paraissent des bouquets de fleurs blanches ou rosées, accompagnées des fruits orange de l'année précédente, de 25mm de diamètre, contrastant avec feuillage sombre. Assez rustique, cette espèce est sans exigence mais n'aime ni l'ombre ni un sol humide (Burnie et al., 2005).



Photo 01: Aspect de l'arbre d'*Arbutus unedo* L. (Tonelli et Gallouin, 2013).

I.3. 2. Les feuilles et fleurs

Son beau feuillage dense et persistant, en disposition alterne, se renouvellent progressivement après 1 ou 2 ans (Photo 02), courtement pétiolées (de 1 cm ou de moins) sans stipules, elles sont coriaces, alternatives, épaisses, simples, elliptiques, entières ou dentées de 4 à 8 cm de longueur sur 2 à 4 cm de largeur, luisantes et d'un beau vert sombre dessus et vert pâle un peu argenté dessous (Tonelli et Gallouin, 2013).

Les fleurs sont en forme de cloche, avec des lobes recourbés, 8-9 mm de long, blanc, blanc crème, translucides souvent rose pâle et portées par un pétiole rougeâtre, s'ouvrent à la fin de l'été (Photo 02). Elles sont une source significative de nectar et pollen pour les abeilles (More et White, 2005; Males et al., 2006; Gomes, 2011; Tonelli et Gallouin, 2013).



Photo 02: Aspect des feuilles et fleurs d'arbousier (Tonelli et Gallouin, 2013).

I.3. 3. Les fruits

Les fruits sont des baies globuleuses, charnues, sphériques, à peau rugueuses, couverte de petites pointes coniques environ 15-20 mm de diamètre, ils ressemblent vaguement à une fraise, prennent environ 12 mois pour mûrir et deviennent rouges et savoureuse. Ces baies sont comestibles, la chair jaune est pulpeuse et pleine de pépins, le processus de fleuraison et de fructification s'étend d'octobre à février et l'arbre porte des fleurs et des fruits matures en même temps (Photo 03) (More et White, 2005; Males *et al.*, 2006; 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).



Arbutus immature



Arbutus mature

Photo 03 : Fruits d'arbousier (Tonelli et Gallouin, 2013).

I.4. Répartition géographique

L'arbre à fraise est un élément typique de la région biogéographique méditerranéenne où il montre une distribution circumméditerranéenne ordonnée. Ce petit arbre occupe une frange côtière étroite de la Tunisie au Maroc le long du Nord de l'Afrique et de l'Espagne à la Turquie le long de l'Europe méridionale. La plante est également très répandue dans l'Ouest de la péninsule Ibérique et le Nord

l'arbre à fraise couvre le long du Nord de l'Europe Atlantique, en entrant dans la région euro-sibérienne (Figure 01). Ainsi, il se trouve dans le Nord de la péninsule Ibérique, Ouest de la France, et il y a une population isolée dans le Sud-Ouest de l'Irlande (Figure 01) (Doukani et Tabak, 2014; Santiso et al., 2016).

Cette espèce sclérophylle peut être trouvée à partir du niveau de la mer à 800-1200 m et croît dans différents types de sols mais, comme beaucoup d'espèces Ericaceae, elle a une certaine préférence pour les sols acides (Molina et al., 2011).

Il est très répondeu en raison de sa tolérance à la sécheresse et sa capacité à se régénérer et recoloniser les forêts incendiées (Doukani et Tabak, 2014).



Figure 01 : Distribution approximative d'*Arbutus unedo* L. (Oliveira, 2010).

I.5. Utilisation alimentaire

Les fruits de l'arbre à fraise (*Arbutus unedo* L.) sont consommés principalement comme produit transformé, mais peuvent être une bonne source d'antioxydants si elles sont consommées comme des fruits crus, elles ont une certaine importance dans les communautés agricoles locales où elles sont utilisées pour la production de boissons alcoolisées, les confitures, gelées et marmelades (Fortalezas et al., 2010 ; Bouzid, 2014).

Les industries alimentaires exigent de nouveaux ingrédients pour le développement des aliments commerciaux. Les fruits d'arbousier peuvent avoir un grand potentiel en tant que source de couleurs et de saveurs inhabituelles, ainsi que des composés bioactifs (Ruiz-Rodríguez et al., 2011). En effet, Ganhão et al. (2010) ont constaté que l'addition d'extraits de fruits comme ingrédient fonctionnel dans des produits carnés transformés empêche l'oxydation des protéines. D'autre part, les fruits d'arbousier pourraient également être utilisés en tant que colorant alimentaire, vu leur teneur en β -carotène et en anthocyanes (Molina et al., 2011).

Ces fruits pourraient aussi être considérés comme des nutraceutiques intéressants à valeur élevée, étant une source de composés bioactifs pour les compléments alimentaires ou les aliments fonctionnels, les bienfaits sanitaires de son intégration ou de leurs extraits en yaourts, tartes et pâtisseries, céréales ou produits à base de viande sont récemment décrit (Ruiz-Rodríguez et al., 2011).

I.6. Les composés antioxydants de fruit

Les fruits d'*Arbutus unedo* L. ont un large éventail d'antioxydants, y compris la vitamine C et E, la niacine, les caroténoïdes et les composés polyphénoliques (figure 5) (Molina et al., 2011).

Plusieurs acides organiques à savoir l'acide fumarique, l'acide lactique, l'acide malique, l'acide subérique et celui citrique, et d'autre phénoliques, comme l'acide gallique, l'acide gentisique, l'acide protocatéchique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique et l'acide m-anisique sont identifiés dans ces fruits (Oliveira, 2010).

La quantité de vitamines et de caroténoïdes présent dans les fruits, bien que n'étant pas être très élevé, ne devrait pas être ignorée. La teneur totale en vitamine E a été déterminée par Barros et al. (2010), montrant que les fruits présentent dans leur composition $23,46 \pm 0,26$ mg / 100 g de poids sec de tocophérols totaux, dont l' α -tocophérol est la forme la plus importante de cette vitamine qui $21,98 \pm 0,18$ mg / 100 g de poids sec. Une autre vitamine a été déjà trouvée dans les baies de l'arbousier, c'est la vitamine C (Oliveira, 2010). Les caroténoïdes sont également présents dans les fruits, en particulier la β – carotène (Oliveira, 2010).

La fraction phénolique présente dans les fruits de cet arbuste inclut plusieurs classes chimiques, telles que les tanins, les flavonoïdes, les dérivés d'acide ellagique et les dérivés d'acide gallique. Concernant les flavonoïdes, quatre anthocyanes différents peuvent être trouvés: delphinidine-3-galactoside, cyanidine-3-glucoside, cyanidine-3-arabinoside et cyanidine-3-galactoside (Oliveira, 2010).

Les proanthocyanidines sont aussi présents dans ces fruits dont dix composés ont été identifiés et quantifiés par **Pallauf et al. (2008)**, à savoir la gallocatéchine, la gallocatéchine-4,8-catéchine, l'épicatéchine-4,6-catéchine, la catéchine-4,8-catéchine, l'épicatéchine-4,8-épicatéchine -4,8-catéchine, la catéchine, l'épicatéchine-4,8-épicatéchine, l'épicatéchine-4,8-épicatéchine-4,8-épicatéchine, l'épicatéchine-4,6-catéchine (**Oliveira, 2010**).

Appartenant également aux flavonoïdes, les flavonols sont aussi bien présents. Les plus abondants sont les dérivés de quercétine (quercétine-3-rutinoside, la quercétine-3-xyloside et de quercétine-3-rhamnoside) et myricétine-3-xyloside (**Oliveira, 2010**).

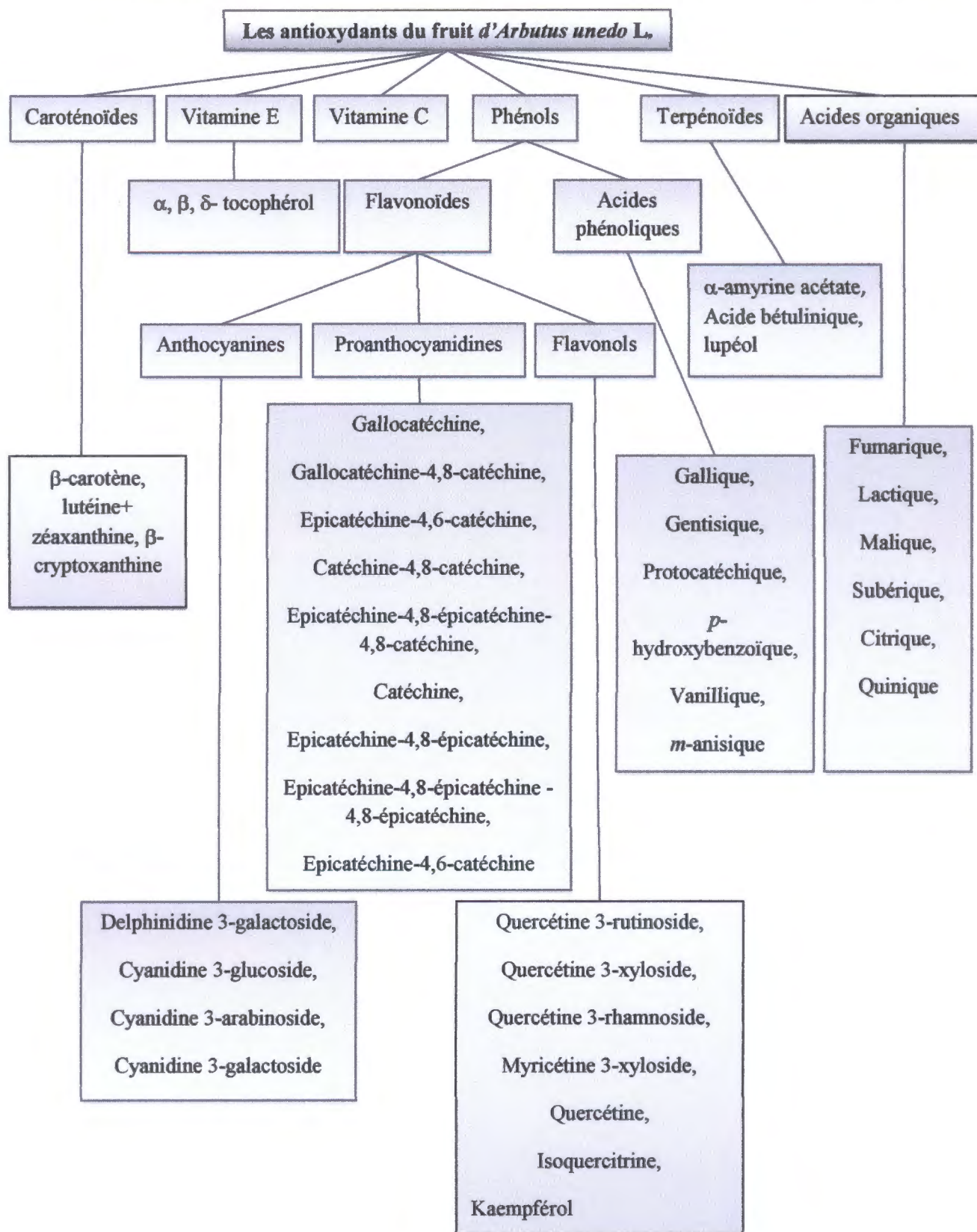


Figure 02 : Les composés d'antioxydant présentent dans l'arbre *Arbutus unedo* L. (Oliveira, 2010).

I.7. Application des antioxydants dans le domaine alimentaire

La connaissance des facteurs promouvant l'oxydation aide le scientifique à développer des stratégies pour empêcher et contrôler cette réaction, ce processus d'oxydation intervient lors du stockage des beurres; il provoque la formation de peroxydes dont la dégradation libère des aldéhydes et des cétones responsables du goût de suif. L'oxydation est favorisée par de nombreux facteurs : lumière, température, acidité, NaCl, fer, cuivre, etc. cependant, elle est freinée par l'utilisation des antioxydants (**Graille, 2003 ; Jeantet et al., 2006**).

Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont le butyl-hydroxyanisole (BHA) et le butyl-hydroxytoluène (BHT), ces deux composés sont assez volatils et se décomposent rapidement à des températures élevées. Il existe de sérieux problèmes concernant l'utilisation et la toxicité de ces deux produits synthétiques, tant au niveau de leur métabolisme que de leur accumulation dans les tissus de l'organisme humain; ainsi les préparations d'antioxydants naturels sont vivement recherchées (**Branen, 1975 ; Linderschmidt et al., 1986**).

Le rôle des antioxydants dans l'industrie agroalimentaire consiste à réduire la dégradation des aliments durant l'entreposage. Néanmoins, il est quasi impossible de maîtriser pratiquement tous les facteurs qui provoquent l'oxydation. Cependant l'ajout des antioxydants peut prévenir ou ralentir le processus d'oxydation (**Djenane, 2009; El-Kalamouni, 2010**).

L'utilisation des extraits de plantes ou de fractions enrichies est devenue aujourd'hui une méthode très attractive pour préserver les aliments. D'autres applications des extraits de fruits dans la technologie alimentaire ont été signalés, tels que l'enrichissement de yaourts avec l'extrait de fruit d'*Arbutus unedo* qui améliore l'activité antioxydante et la survie de sa communauté microbienne, sans incidence sur les caractéristiques chimiques et microbiologiques des yaourts (**Madhavi et al., 1995 ; Miguel et al., 2014**).

Chapitre II

Les plans d'expériences

II.1. Définition et données

Un plan d'expériences est l'organisation « d'une séquence d'essais expérimentaux pour obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences et la meilleure précision possible sur les réponses calculées par le modèle ». Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse (Goupy, 2000 ; Box, 2005).

Les plans d'expériences ont pour objectif de fournir à l'analyste, moyennant un nombre d'expériences restreint, un maximum d'informations pertinentes pouvant expliquer certains effets et prédire les réponses étudiées. Ils permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y , et des variables, x_i . Il faut penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type : $y = f(x_i)$ (Bouabidi, 2013 ; Talantikite-Kellil, 2015).

Dans la méthodologie des plans d'expériences, tous les facteurs considérés sont étudiés simultanément. La stratégie consiste à réaliser les expériences de manière programmée et raisonnée, en faisant varier à la fois les niveaux de tous les facteurs (Goupy, 1996 ; Bouabidi, 2013).

Le meilleur moyen pour y parvenir, tout en expliquant les phénomènes observés et en exploitant les résultats obtenus est l'utilisation des outils mathématiques combinés aux outils statistiques ; ce qui rend complexe leur mise en œuvre. Cela n'est possible que par l'utilisation des logiciels développés qui rendent le travail accessible, facile et rapide (Marini, 2006).

II. 2. Terminologie

II.2.1. Notion d'espace expérimental

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la *réponse*, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs variables. Au lieu du terme « variable » on utilisera le mot *facteur*. La réponse dépend donc d'un ou de plusieurs facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (Figure 03). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée *niveau*. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas (noter -1), celle supérieure est le niveau haut (noter +1) (Goupy, 2006).

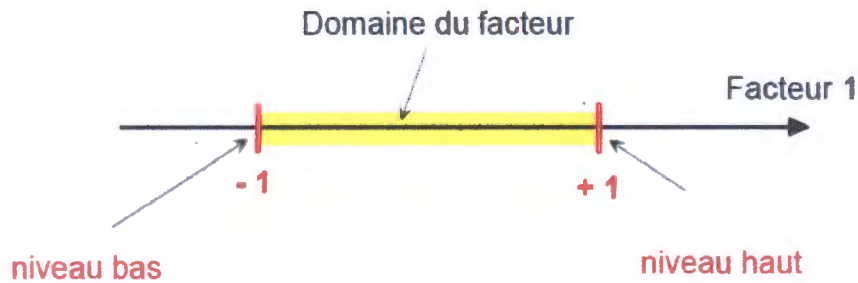


Figure 03 : Domaine de variation d'un facteur (Goupy, 2006).

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur ou plus simplement le *domaine* du facteur, la réunion de tous ces domaines définit le « **domaine expérimental** » ou le « *domaine d'étude* ». S'il y a un second facteur, il est représenté, lui aussi, par un axe gradué et orienté disposé orthogonalement au premier. L'ensemble des facteurs crée un espace de dimensions égal au nombre de facteurs choisis. Cet espace est appelé espace expérimental (Goupy, 2006 ; Turgis, 2013).

II.2.2. Notion de surface de réponse

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (Figure 04) (Goupy, 2006).

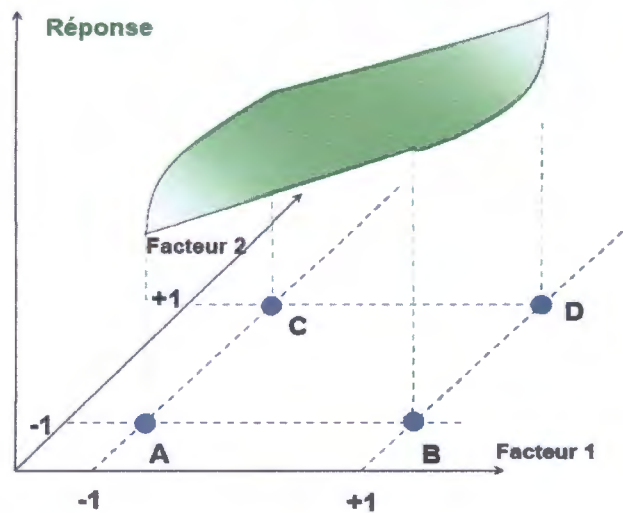


Figure 04 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse (Goupy, 2006).

II.2.3. Notions de statistique appliquées aux plans d'expériences

II.2.3.1. Equation mathématique

La fonction qui lie les facteurs aux réponses est la suivante (Goupy et Creighton, 2006):

$$y = \sum a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ii} x_i^2 + \dots$$

Où :

y : La grandeur à laquelle s'intéresse l'expérimentateur ; c'est la réponse ou la grandeur d'intérêt,

x_i : Niveau du facteur i ,

x_j : Niveau du facteur j ,

a, a_i, a_{ij}, a_{ii} : Les coefficients du polynôme.

II.2.3.2. Désirabilité

La fonction désirabilité est très utile quand il faut trouver le meilleur compromis entre plusieurs réponses, elle varie de 0 à 1 dont la valeur 1 correspond à une satisfaction maximale et la valeur 0, à un refus complet (Goupy, 2005).

II.2.3.3. Analyse de la variance et Coefficient de détermination (R^2)

L'analyse de la variance consiste à rechercher les sources de variation des réponses (Goupy et Creighton, 2006).

L'analyse de la variance permet de calculer une statistique très utile ; le R^2 ou R carré. Cette statistique est le rapport de la somme des carrés des réponses calculées (corrigées de la moyenne) à la somme des carrés des réponses mesurées (corrigées de la moyenne). Le R^2 est donc une mesure de la qualité du modèle. S'il est égal à 1, le modèle permet de retrouver la valeur des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'en dit pas plus que la moyenne des réponses (Goupy et Creighton, 2006).

II.2.3.4. P-value

La P -value est la probabilité qu'un coefficient soit négligeable. On calcule cette P -value à partir du rapport du coefficient à son écart-type (test de Student) (Goupy et Creighton, 2006).

II.3. Types de plans d'expériences selon l'objectif recherché

Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur (Talantikite-Kellil, 2015). Selon l'objectif recherché, on peut distinguer trois types de plans d'expériences, les plans de criblage, de modélisation et de mélange (Goupy, 2006).

II.3.1. Les plans de criblage

La technique de criblage (ou *screening design* en langue Anglaise) permet d'étudier dans un domaine expérimental inconnu les facteurs affectant une variable de réponse, et d'isoler les plus influents avec un minimum d'essais (Goupy, 2006 ; Wahdame, 2006).

II.3.2. Les plans de modélisation

Leur objectif est de trouver la relation mathématique qui lie les réponses aux facteurs. Les plans factoriels complets et fractionnaires ainsi que les plans pour surfaces de réponses font partie de cette famille (Goupy, 2006).

II.3.3. Les plans de mélange

Leur objectif est le même que les plans de modélisation mais les facteurs ne sont pas indépendants. Il faut prendre en compte pour la construction de ces plans le fait que leurs sommes ou leurs rapports doit être égale à une constante (Goupy, 2006).

II.4. Plans pour Surfaces de Réponse

Généralement, pour optimiser les conditions opératoires d'une méthode analytique, les plans d'expériences, notamment la méthodologie des surfaces de réponse, sont utilisés (Duarte et Capelo, 2006).

La Méthodologie des Surfaces de Réponse est une collection de stratégies expérimentales de méthodes mathématiques et statistiques qui permet à un expérimentateur de choisir la meilleure des combinaisons des niveaux des paramètres qui optimisent un processus (Koksoy et Doganaksoy, 2003 ; Noordin et al., 2003; Youn et choi, 2004).

Elle est mise en œuvre pour élaborer des modèles descriptifs ou prévisionnels des phénomènes étudiés. Elle permet une étude qualitative des facteurs. Son utilisation est intéressante dès lors qu'il faut effectuer des optimisations, mettre au point des formulations permettant d'estimer les interactions entre facteurs. La méthodologie de surface de réponse permet, grâce à l'idée que l'on

peut se faire de la forme de la surface de réponse, d'améliorer la qualité (la robustesse, la fiabilité) des produits (Wahdame, 2006).

L'objectif d'une telle méthodologie est de (Lepadatu, 2006):

- ✓ déterminer les conditions de fonctionnement optimales pour un système ou un processus ;
- ✓ déterminer une région de l'espace des facteurs dans laquelle des caractéristiques de fonctionnement (les réponses) sont satisfaites ;
- ✓ modéliser et analyser un processus pour lequel la réponse est influencée par plusieurs variables.

Cette technique, issue des techniques de plans d'expériences, vise à déterminer d'une façon quantitative les variations de la fonction réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative d'un certain processus ou système (Lepadatu, 2006).

II.4.1. Le plan composite central (CCD : central composite design)

Le plan composite central permet d'estimer les paramètres de régression pour ajuster un modèle de régression polynomiale du second degré à une réponse donnée. Un polynôme, telle que donnée par l'équation (*) permet de quantifier les relations entre la réponse mesurée y et un certain nombre de variables expérimentales $X_1 \dots X_k$, k étant le nombre de facteurs considérés, β sont des régresseurs et ε est une erreur associée au modèle (Dutka et al., 2015) :

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_k X_k + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{kk} X_k^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \dots + \beta_{k-1,k} X_{k-1} X_k + \varepsilon \dots (*)$$

Le plan composite centré combine un plan factoriel complet ou fractionnaire à deux niveaux avec des points supplémentaires (points d'étoile) et au moins un point au centre de la région expérimentale. Il a été le plan expérimental le plus accepté pour les modèles de second ordre qui a une large application dans la modélisation des processus (Ferreira et al., 2004 ; Savic et al., 2015).

La figure 05 représente un exemple de plan composite centré pour l'étude de deux paramètres (les essais supplémentaires donnant des renseignements sur la courbure de la surface sont placés à l'extérieur du domaine expérimental) (Faucher, 2006).

Le nombre total d'essais devant être menés ; N , va dépendre du nombre de facteurs k étudiés et du nombre de répétitions au centre du domaine ; n_0 : $N = 2k + 2.k + n_0$ (Faucher, 2006).

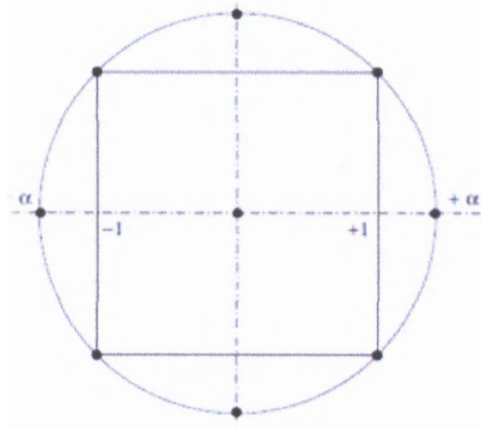


Figure 05 : Plan composite centré pour l'étude de deux facteurs (Faucher, 2006).

Etude
Expérimentale

Matériel et Méthodes

II. 1. Matériel

II. 1. 1. Matériel végétal

II. 1. 1. 1. Fruit d'*Arbutus unedo* L.

Le matériel végétal utilisé dans notre travail est composé d'un seul échantillon du fruit d'*Arbutus unedo* L. mature (rouge) de la région de Texenna de la Wilaya de Jijel, récolté durant la période allant de 20 Novembre 2015 au 08 janvier 2016.

Les fruits ont été conservés à - 4 °C dans un congélateur domestique (Condor) jusqu'à leur utilisation pour analyse (Photo 04).



Photo 04 : Les baies mures d'arbose à l'état congelé.

II. 1. 2. Matériel biologique

II. 1. 2. 1. Beurre commercial « IGILAIT »

Le beurre utilisé pour le procédé de bioconservation est du beurre de vache fabriqué au sein de la laiterie IGILAIT, acheté auprès d'une supérette sise à coté de notre université (Photo 05).



Photo 05 : Beurre « IGILAIT » utilisé pour la bio-conservation.

II.1.3. Les produits chimiques et réactifs : Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants:

- **Les acides et bases :** Hydroxyde de sodium (NaOH) (1M), acide sulfurique (0.6 M), acide acétique glacial, l'acide chlorhydrique (HCl 0.5N), thiosulfate de sodium (0.01N), hydroxyde de potassium KOH (0.1N et 0.5N).
- **Les réactifs:** Folin-Ciocalteu, empois d'amidon, phénol phtaléine.
- **Les antioxydants et radicaux libres standard :** Quercétine, acide gallique, acide ascorbique, DPPH.
- **Alcool et autres produits chimiques :** Méthanol, éthanol, phosphate de sodium (28 mM) , dichlorométhane, potasse alcoolique, isobutanol-ethanol (V/V), toluène-ethanol(V/V), molybdate d'ammonium (4 mM), nitrite de sodium (NaNO₂) (5 %), trichlorure d'aluminium (AlCl₃) (10 %), carbonate de sodium (7.5 %), cyclohexane, iodure de potassium (KI).

II.1.4. Appareillage : L'appareillage utilisé au cours de cette étude est le suivant :

- Agitateur électromagnétique (FALC);
- Bain Marie (Memmert) et bain Marie agitateur (Memmert) ;
- Balance (KERN EMB 600-2) et balance analytique (Kernals 220.4N) ;
- Broyeur électrique (Retsch type GM200);
- Centrifugeuse électrique (Hettich) ;
- Réfrigérateur (Condor) ;
- Etuves (Memmert), et étuve à agitation (INFORS HT ecotron) ;
- pH mètre (Hanna pH 211) (inola);
- Rotavapeur (Heidolph) ;
- Spectrophotomètre UV-visible (JENWAY) ;
- Vortex électrique (MS2 Minishaker, VWR VV3).

II. 2. Méthodes

II.2.1. Préparation de la poudre des échantillons

Au laboratoire, l'Arbouse mature a été séché dans une étuve réglée à 40°C pendant 72 heures puis broyé dans un broyeur mécanique (Photo 06). La poudre a été conservée dans des flacons en verre fermés jusqu'à leur utilisation.



Photo 06 : Poudre de fruit mature d'*Arbutus unedo* L.

II.2.2. Choix de meilleur solvant d'optimisation

II.2.2.1. Préparation des extraits bruts secs

Les extraits ont été préparés selon la technique décrite par **Isbilir et al. (2012)** avec quelques modifications; une prise d'essai de 2g de poudre des fruits a été mise à macérer dans 10ml de méthanol absolu (éthanol absolu) sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait alcoolique a été récupéré après filtration à l'aide de papier filtre, puis centrifugé à 3500 rpm/5min et filtré pour une deuxième fois. Le résidu obtenu est conservé par congélation.

II.2.2.2. Détermination de l'activité antioxydante totale (TAC)

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait méthanolique et éthanolique est mélangé avec 3 ml de la solution du réactif (0.6 M acide sulfurique (1ml), 28 mM phosphate de sodium (1ml) et 4 mM 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 695nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et/ ou éthanol 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 d'une courbe d'étalonnage (**Prieto et al., 1999**).

II.2.3. Optimisation de l'extraction des substances bioactives par la méthodologie de surface de réponse (CCD à précision uniforme)

Différents facteurs peuvent influencer sur la qualité de l'extraction. Dans notre étude, la méthodologie de surface de réponse a été appliquée afin d'optimiser les principales variables. Pour explorer l'effet des variables indépendantes sur la réponse dans la marge de la recherche, un plan central composite à précision uniforme avec quatre variables indépendantes (X1 ; la température, X2 ; temps

d'extraction, X3 ; la concentration de solvant, X4 ; le ratio liquide/solide) a été exécuté, ces facteurs sont représentés en deux niveaux codés par -1 et +1 pour le minimum et le maximum respectivement. Le Tableau 02, regroupe les facteurs utilisés ainsi que leurs niveaux.

Tableau 02 : Les facteurs et leurs niveaux choisis pour l'optimisation de l'extraction

Facteurs	Niveaux	
	-1	+1
Concentration solvant (Con)	70 %	90%
Température d'extraction (T°)	30°C	60°C
Temps d'extraction (Tem)	90 min	240min
Ratio liquide /solide (L/S)	10 ml/g	25ml/g

Les résultats expérimentaux ont été adaptés à un modèle polynomiale de second degré, et les coefficients de régression ont été déterminés. Le modèle quadratique pour prévoir le point optimal a été exprimé selon l'équation suivante :

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Avec :

Y_i : La réponse ;

β_0 : La constante du modèle ;

X_i, X_j : Les variables indépendantes ;

β_i : Le coefficient linéaire ;

β_{ij} : Le coefficient d'interaction ;

β_{ii} : Le coefficient quadratique.

II.2.4. Préparation d'extrait brut sec

Les extraits ont été préparés selon la technique décrite par **Isbilir et al. (2012)** avec quelques modifications en suivant la matrice d'expérience donnée par le logiciel JMP7 dont les niveaux de chaque facteur étudiés sont variés d'une expérience à l'autre.

II.2.5. Détermination de la teneur en polyphénols totaux**II.2.5.1. Dosage des phénols totaux**

La teneur en phénols totaux des extraits des fruits a été déterminée par la méthode de **Singleton et Ross (1965)** en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu.

Un volume de 200 µl d'extrait de fruit à concentration de 0,4 mg/ml est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Le mélange est agité et laissé à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance est mesurée à 765 nm.

Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été réalisée (*Annexe I*). Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

II.2.5.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par **Zhishen et al. (1999)**. Une quantité de 500 µl de l'extrait méthanolique (0,4 mg/ml) est ajoutés à 1500 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 % sont ajoutés au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % (m/v) sont rajoutés. Après une incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1M) 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 (EC)/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.2.6. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits**II.2.6.1. Activité antioxydante totale (TAC)**

Un volume de 0.3 ml d'extrait choisi à concentrations 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 4 mM 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.2.6.2. Piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Benhammou et al. (2007). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,5 mg de DPPH dans 100 ml du méthanol.

Un volume de 50 µl de l'extrait méthanolique à concentration 0,4mg/ml est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration.

Pour le calcul des pourcentages d'inhibitions, nous avons utilisé la formule suivante :

$$I \% = ((Ac - At) / Ac) \times 100$$

Où : I %: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

Ac : absorbance du contrôle

At : absorbance du test effectué

II.2.7. Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique du modèle est exécutée en analysant la variance (ANOVA). Cette analyse inclut le test de Fischer (signification du modèle globale), sa probabilité associée p(F), le coefficient de corrélation R et le coefficient de détermination R² qui mesure la qualité d'ajustement du modèle de régression. Pour chaque variable, les modèles quadratiques sont représentés par les contours profilés et les courbes de la surface de réponse (3D). Cette analyse est réalisée par le logiciel JMP Statistical Discovery v7.0.1 (USA)

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Avec :

Y_i : la réponse ;

β_0 : la constante du modèle ;

X_i, X_j : les variables indépendantes ;

β_i : le coefficient linéaire ;

β_{ij} : le coefficient d'interaction ;

β_{ii} : le coefficient quadratique.

II.2.8. Analyse qualitative par HPLC

La méthode décrite par Amarowicz *et al.* (2005) a été appliquée. 20 μ l de l'extrait optimal ont été injecté sur une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125 x 4.6 mm. La phase mobile est constituée de trois éluant : 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.

II.2.9. Utilisation de l'extrait optimal dans le processus de la conservation

II.2.9.1. Préparation de l'extrait

Après optimisation et validation du modèle, les conditions optimales qui donnent une activité antioxydante optimale ont été appliquées pour la préparation d'extrait brut qui a été dilué par la suite à une concentration de 2 g/ml en utilisant l'eau distillée.

II.2.9.2. Essai de conservation du beurre par l'extrait de fruit

550 g du beurre commercial « IGILAIT » ont été coupé en morceaux homogène dont le poids varie entre 23 ± 2 g, ces morceaux ont été répartis dans un plateau dont la moitié a été recouverts par l'extrait de fruit déjà préparé et l'autre partie a été utilisée comme témoin. Les échantillons ont été emballés par un papier film puis stockés au froid (réfrigérateur).

II.2.9.3. Analyses physicochimiques du beurre pendant la conservation

Les analyses ont été réalisées en double répétions chaque trois jours (J0, J3, J6, J9, J12, J15).

II.2.9.3.1. Détermination de l'acidité

L'acidité est mesurée selon la norme AFNOR (1984). 6g de la matière grasse est dissout dans 100ml de mélange éthanol/toluène (V/V), puis titré sous agitation avec la solution d'hydroxyde de

potassium (KOH) à 0.5N en présence de 0.3ml de la solution de phénolphaléine à 1% dans l'éthanol, jusqu'au virage de l'indicateur (coloration rose).

L'acidité, exprimée en pourcentage est égale à :

$$\text{Acidité} = (V \times C \times M) / (10 \times m)$$

Où :

V : est le volume en ml de solution titrée de KOH utilisé ;

C : est la concentration exacte, en moles / litre, de la solution titrée de KOH utilisé ;

M : est le poids molaire, en g/mole, de l'acide adopté pour l'expression de résultat (=282) ;

m : est la prise d'essai en grammes.

II.2.9.3.2. Indice de peroxyde

Le principe repose sur le titrage de l'iode libéré par une solution de thiosulfate de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. 1g de la matière grasse est pesée dans une fiole à 0.001g près de mélange avec 10ml de dichlorométhane ; le tout est agité. 15ml d'acide acétique glacial ainsi que 1ml d'iodure de potassium (KI) sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 1min et laissé reposer pendant 5min à l'abri de la lumière et à une température de 15 à 25°C. 75 ml d'eau distillée sont additionnés suivi d'un titrage de l'iode libéré avec une solution de thiosulfate de sodium [$\text{C}(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$] à 0.01N en agitant vigoureusement et en employant la solution d'amidon (1g/100ml) comme indicateur jusqu'à disparition de la couleur (**Idoui et al., 2010**).

Un essai à blanc est effectué simultanément.

L'indice de peroxyde en milliequivalent d' O_2/Kg est calculé selon l'équation :

$$I_p = [(V - V_0) \times T / m] \times 100$$

Où :

V : est le volume de thiosulfate de sodium de l'échantillon ;

V₀ : est le volume requis pour titrer le blanc ;

T : le titre exacte de thiosulfate de sodium utilisé ;

m : est la prise d'essai en grammes.

II.2.9.3.3. Indice de saponification

L'indice de saponification est déterminé selon la méthode décrite par **Lecoq (1965)**. Pour cela, à 1g de la matière grasse a été ajouté 25ml de potasse alcoolique, après agitation, le mélange a été porté à ébullition pendant 15 à 30 minutes en agitant de temps en temps. Après refroidissement, nous avons additionné 5 gouttes de phénol phtaléine au mélange. L'excès de potasse a été titré par l'acide

chlorhydrique 0.5N jusqu'à décoloration. Un blanc a été effectué dans les mêmes conditions que précédemment décrite mais sans matière grasse pour titrer la solution de potasse en jeu. L'indice de saponification est exprimé par la formule suivante:

$$I_s = (V_{\text{blanc}} - V_{\text{essai}}) \times N_{\text{HCl}} \times PM_{\text{KOH}} / P$$

Avec :

P : prise d'essai (g) ;

V_{blanc} : volume de l'HCl 0.5N utilisé lors de la réaction du blanc ;

V_{essai} : volume de l'HCl 0.5N utilisé lors de la réaction de l'essai ;

N_{HCl}=0.5N : normalité de l'HCl ;

PM_{KOH} =56.1g/mol : poids moléculaire de potasse alcoolique.

II.2.9.3.4. Indice d'acide

Dix grammes de chaque échantillon de beurre sont introduits dans un Erlenmeyer puis additionnés de 10 ml de KOH alcoolique (0.5 N), 10 ml de la solution d'isobuthanol-éthanol (V/V) et enfin 3gouttes de la solution de phénol phtaléine. La titration est réalisée à l'aide de l'acide chlorhydrique 0.5N jusqu'à virage de l'indicateur à l'incolore (**Idoui et al., 2010**).

Le témoin est réalisé de la même manière mais sans matière grasse.

$$I_a = (V_{\text{HCl}}^{\text{témoin}} - V_{\text{HCl}}^{\text{essai}}) \times N_{\text{HCl}} \times PM_{\text{KOH}} / P$$

Avec :

V : volume d'HCl utilisé (ml) ;

N : la normalité de KOH ;

P : la prise d'essai (g).

II.2.9.3.5. Détermination du pH

La mesure a été réalisée en plongeant l'électrode du pH mètre dans le beurre liquéfié. La valeur du pH est enregistrée sur l'écran du pH mètre.

II.2.9.4. Analyse statistique des résultats

L'analyse des données expérimentales de l'étude de la qualité du beurre au cours de la conservation est réalisée avec le logiciel « SPSS_Statistics_22 ». Les résultats obtenus sont soumis au test de Student (test d'égalité des espérances). A $p < 0,05$, la différence est considérée significative.

Résultats et Discussion

III. Résultats et Discussion

Nous avons constaté à travers la recherche bibliographique que plusieurs publications avaient comme thématique, les antioxydants naturels du fruit d'*Arbutus unedo* L. et leurs applications dans la bioconservation des produits alimentaires, cependant, peu de résultats existent sur le même produit Algérien, de ce fait, nous avons optimisé l'extraction de certaines substances bioactives, par la suite, nous avons déterminé l'activité antioxydante totale, pour en finir à un test de la bioconservation du beurre. Les résultats que nous avons trouvé font l'objet d'une interprétation et une discussion dans cette troisième partie de l'étude.

III. Préparation des extraits bruts secs

III.1. Sélection du meilleur solvant pour l'optimisation de l'extraction des substances antioxydantes

D'une manière générale, le choix du solvant est considéré comme un paramètre important pour l'extraction, car il peut affecter la solubilité des ingrédients cibles. Le méthanol et l'éthanol sont les solvants les plus utilisés pour l'extraction. Dans notre étude, la capacité antioxydante totale a été choisie comme un paramètre pour déterminer le meilleur solvant pour l'extraction.

La capacité antioxydante totale des extraits testés, est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (Prieto et al., 1999).

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 donnée dans l'annexe I.

Selon la courbe d'étalonnage, nous constatons que la capacité antioxydante totale des extraits méthanoliques (0,776 mg EAA/ g MS) est supérieure à celle des extraits éthanolique (0.450 mg EAA/ g MS); sur la base de ces résultats, le méthanol a été choisi comme solvant d'extraction car il possède la meilleure capacité antioxydante totale.

L'étude de Kchaou et al. (2013) sur l'optimisation de l'extraction des polyphénols et de la capacité antioxydante de huit variétés de dattes ont montré que le meilleur solvant pour l'extraction des composés phénoliques est l'acétone 70% suivi par le méthanol 50%, alors que l'activité antioxydante la plus élevée est obtenue avec l'extrait méthanolique 50%. Par contre Lekbir et al. (2013) ont rapporté que le méthanol est le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante de la variété *Deglet-Nour*, l'acétone et l'éthanol sont moins efficaces.

III.2. Optimisation de l'extraction des substances bioactives par la méthodologie surface de réponse type CCD précision uniforme

Le modèle plan central composite désigne à précision uniforme est important pour la détermination des interactions entre les différents facteurs étudiés ainsi que la détermination de leurs valeurs optimales d'extraction. Le plan composite centré (CCD) a de plus en plus une large application dans la modélisation des processus. En fait, le CCD représente un modèle expérimental, qui appartient à la méthodologie de surface de réponse (RSM).

Kassama et al. (2008) ont utilisé ce modèle pour optimiser les paramètres pour l'extraction du dioxyde de carbone supercritique de lycopené ($C_{40}H_{56}$) à partir de peaux de tomates séchées. **Amyrgialaki et al. (2014)** ont utilisé le CCD pour l'optimisation de l'extraction des phénols de la grenade décortiquée (*Punica granatum*) en utilisant des systèmes de solvants eau / éthanol. En outre, **Chua et al. (2009)** ont optimisé l'extraction par ultrasons des phospholipides de la fibre de palme pressée.

III.2.1. Constitution de la matrice d'expérience

Dans notre étude, le modèle CCD à précision uniforme a été appliqué pour l'optimisation :

- L'extraction des polyphénols totaux (**Réponse Y_1**).
- L'activité antioxydante totale (**Réponse Y_2**).
- L'extraction des flavonoïdes (**Réponse Y_3**).
- Le piégeage du radical DPPH (**Réponse Y_4**).

Pour les quatre réponses, la détermination des interactions entre les quatre facteurs à savoir la température, le temps de macération, la concentration du solvant et le ratio liquide/solide (matière végétale/ volume du solvant), nous a permis d'obtenir une matrice composée de 31 expériences. Le tableau 03 montre les conditions expérimentales pour chaque expérience.

Les expériences ont été réalisées aléatoirement et les valeurs trouvées ont été comparées avec les valeurs prévues par le model pour vérifier sa performance. L'ajustement du model a été vérifié par le test d'ANOVA, et la linéarité des interactions entre les facteurs indépendants a été vérifiée par la régression en utilisant la méthode des moins carrés. L'analyse a été réalisée en utilisant le logiciel JMP Statistical Discovery v7.0.1 (USA).

Tableau 03: Matrice expérimentale du model factoriel représentant l'effet de différents facteurs sur l'extraction des polyphénols totaux, flavonoïdes, activité antioxydante totale et piégeage du radical DPPH.

Essais	Niveau X	T°(°C)	Tem (min)	[Con]°	L/S (ml/g)	PPT mesuré	TAC mesuré	FLAV mesuré	DPPH mesuré	PPT prévu	TAC prévu	FLAV prévu	DPPH prévu
1	----	30	90	70	10	26.68	16	19.78	52.23	27.853	45.713	20.491	51.065
2	---+	30	90	70	25	19.2	52.25	15.68	59.61	20.447	79.239	13.549	55.009
3	--+-	30	90	90	10	7.93	169.75	22.13	51.54	10.737	176.030	23.960	51.717
4	--++	30	90	90	25	26.14	170.25	21.21	66.01	23.683	187.821	22.483	63.251
5	-+--	30	240	70	10	22.52	87.25	18.14	57.27	27.355	118.190	17.019	56.355
6	-+-+	30	240	70	25	24.54	122.25	16.78	51.65	26.017	119.691	13.841	49.255
7	-++-	30	240	90	10	18.78	190.75	14.99	56.4	17.867	249.108	14.078	52.043
8	-+++	30	240	90	25	28.73	189.9	10.07	52.42	36.880	228.874	16.365	52.532
9	+---	60	90	70	10	33.12	216.83	50.71	60	30.982	216.175	42.584	58.600
10	+--+	60	90	70	25	20.36	302.25	32.32	60.79	22.033	263.726	33.846	56.645
11	++-	60	90	90	10	14.83	118.5	15.25	54.36	14.113	140.893	18.803	48.253
12	+--+	60	90	90	25	24.34	159.33	16.24	54.26	25.517	166.709	15.530	53.887
13	++-	60	240	70	10	28.76	243.5	39	76.11	31.977	245.763	38.341	70.366
14	+++	60	240	70	25	25.89	229.25	37.03	58.83	29.095	261.289	33.369	57.365
15	+++-	60	240	90	10	17.97	159.75	7.85	51.74	22.735	171.080	8.150	55.054
16	++++	60	240	90	25	40.62	174.75	8.74	56.98	40.207	164.871	8.643	49.643
17	a 000	15	165	80	17.5	15.29	120.75	22.14	8.34	10.516	46.693	20.028	11.397
18	A000	75	165	80	17.5	18.97	137.25	31.07	9.31	16.971	153.153	34.398	16.043
19	0a00	45	15	80	17.5	29.49	184.7	40	64.27	31.493	178.203	40.428	69.562
20	0A00	45	315	80	17.5	54.46	300.5	29.28	66.11	45.685	248.843	30.068	70.608
21	00a0	45	165	60	17.5	37.18	254.75	20.5	59.57	33.221	243.723	28.092	65.59
22	00A0	45	165	100	17.5	30.03	324.75	13.21	54.75	27.216	277.623	6.835	58.52
23	000a	45	165	80	2.5	17.42	172.25	6.96	71.93	14.291	121.015	8.563	75.133
24	000A	45	165	80	32.5	28	155.25	2.5	67.08	24.356	148.332	2.113	73.667
25	0000	45	165	80	17.5	28.94	151	21.24	65.14	28.94	151	21.24	65.14
26	0000	45	165	80	17.5	28.94	151	21.24	65.14	28.94	151	21.24	65.14
27	0000	45	165	80	17.5	28.94	151	21.24	65.14	28.94	151	21.24	65.14
28	0000	45	165	80	17.5	28.94	151	21.24	65.14	28.94	151	21.24	65.14
29	0000	45	165	80	17.5	28.94	151	21.24	65.14	28.94	151	21.24	65.14
30	0000	45	165	80	17.5	28.94	151	21.24	65.14	28.94	151	21.24	65.14
31	0000	45	165	80	17.5	28.94	151	21.24	65.14	28.94	151	21.24	65.14

III.2.2. Résultats de l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé en utilisant le réactif du Folin Ciocalteu, les résultats trouvés ainsi que les valeurs prévues (en mg EAG/g MS) sont représentés dans le tableau 03.

En analysant les résultats du tableau 03, il ressort que les taux des polyphénols obtenus varis de 7.93 à 54,46 mg EAG/gMS. La plus faible concentration a été observée avec les conditions 30°C, 90 min, 90° et 10 ml/g pour les variables X₁, X₂, X₃ et X₄ successivement. D'autre part, la valeur

III. Résultats et Discussion

de 54.46 mg EAG/gMS a été obtenue avec une macération à température de 45°C et un temps de 315 min, en utilisant 17.5 ml du solvant à 80°. Les valeurs mesurées sont très proches aux valeurs prévues ce qui nous indique sur le bon fonctionnement du model.

III.2.2.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire

L'analyse du model par le test ANOVA était très hautement significatif ($p < 0.0005$), d'autre part, la valeur du coefficient de détermination (R^2) a été de l'ordre de 0,86 montrant la bonne concordance entre les données expérimentales et celles prévues pour toute la régression. Autrement dit, le modèle de réponse a pu expliquer 86% des variations totales, et par conséquent, il reste 14% des variations qui ne sont pas expliqués par ce dernier. Les résultats de l'analyse de la variance et de la régression sont résumés dans le tableau 04.

Tableau 04 : Résultats de l'analyse de la variance pour le taux des polyphénols totaux (PPT).

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	14	1882.2428	134.446	6.3638
Résidus	15	316.9019	21.127	Prob > F
Total	29	2199.1446		0.0005

III.2.2.2. L'analyse de l'influence et de l'interaction des facteurs

Cette analyse est réalisée en utilisant le test ANOVA pour les facteurs linéaires, de synergie et quadratiques. Les résultats de l'analyse sont consignés dans le tableau 05.

Tableau 05 : Résultats de l'analyse de régression pour le taux des PPT.

Variable	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	28.94	1.876468	15.42	<.0001***
Température (30,60)	1.61375	0.938234	1.72	0.1060
Temps(90,240)	3.5479167	0.938234	3.78	0.0018**
Concentration %(70,90)	-1.50125	0.938234	-1.60	0.1304
Rapport L/S (10,25)	2.51625	0.938234	2.68	0.0171*
T*Tem	0.373125	1.149097	0.32	0.7499
T°*Con	0.061875	1.149097	0.05	0.9578
Tem*Con	1.906875	1.149097	1.66	0.1178
T°*L/S	-0.385625	1.149097	-0.34	0.7418
Tem*L/S	1.516875	1.149097	1.32	0.2066

III. Résultats et Discussion

Variable	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Con*L/S	5.088125	1.149097	4.43	0.0005***
T°*T°	-3.799063	0.877637	-4.33	0.0006***
Tem*Tem	2.4121875	0.877637	2.75	0.0149*
Con*Con	0.3196875	0.877637	0.36	0.7207
L/S*L/S	-2.404063	0.877637	-2.74	0.0152*

(*) Effet significatif (P<0.05). (**) Effet hautement significatif (P<0.01). (***) Effet très hautement significatif (P<0.001).

Les résultats du tableau 05 montrent que le facteur linéaire « Temps » a une influence hautement significative ($p < 0.0018$) sur le rendement d'extraction des polyphénols, cependant le facteur « rapport L/S » a un effet significatif. De même, le facteur d'interaction « Concentration du méthanol*Rapport L/S » et le facteur quadratique « Température*Température » exercent des effets très hautement significatifs avec $p < 0.0005$ et $p < 0.0006$ respectivement. D'autre part, on observe que les facteurs quadratiques « Temps*Temps » et « L/S*L/S » ont une influence significative sur le rendement d'extraction des polyphénols ($p < 0.05$).

Le modèle de régression développé peut être représenté par les surfaces de réponse et le contour plot pour comprendre l'interaction des quatre variables et pour déterminer le niveau optimal de chaque variable pour optimiser la réponse. Les surfaces de réponse avec les contours profiler montrent l'interaction de deux variables indépendantes quand une autre variable est fixée à zéro. Les figures 06, 07, 08, 09, 10 et 11 représentent les surfaces de réponse et les contours profiler établies pour le taux des polyphénols totaux (PPT).

Pour les contours profiler, les parties hachurées correspondent à des réponses trop élevées ou trop faibles. La détermination correcte du taux des polyphénols totaux est obtenue pour des points situés dans la zone blanche.

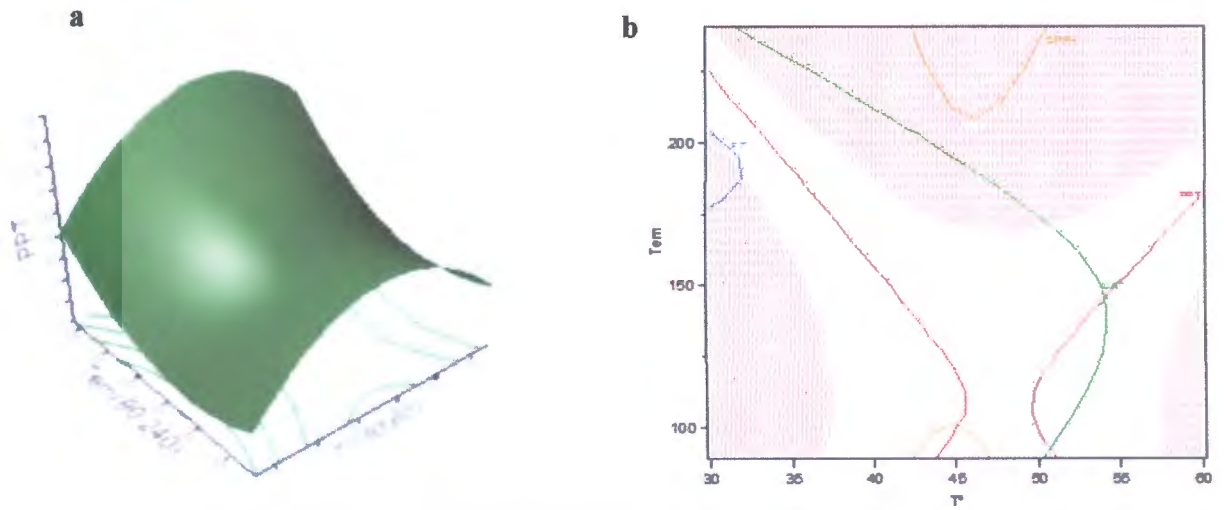


Figure 06 : Corrélation entre temps et température pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

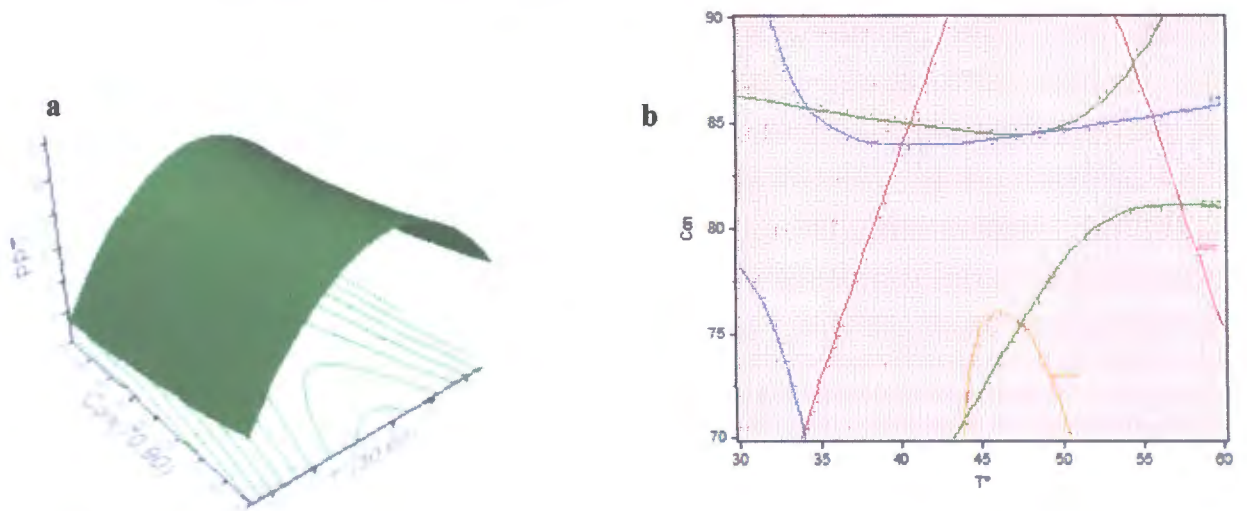


Figure 07 : Corrélation entre Concentration et Température pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

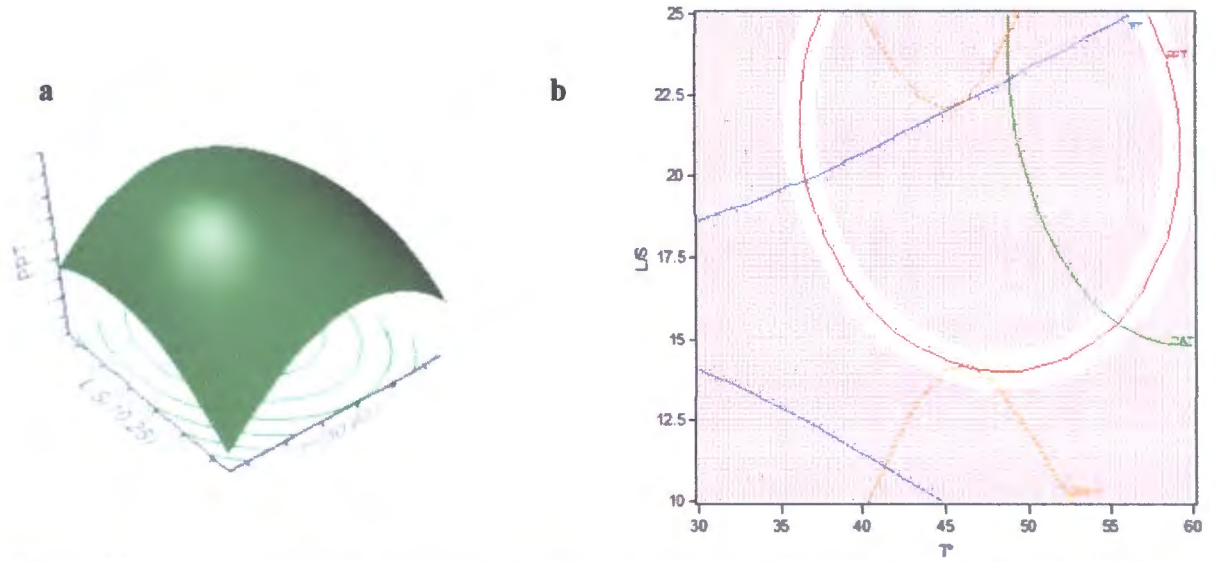


Figure 08 : Corrélation entre rapport L/S et température pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

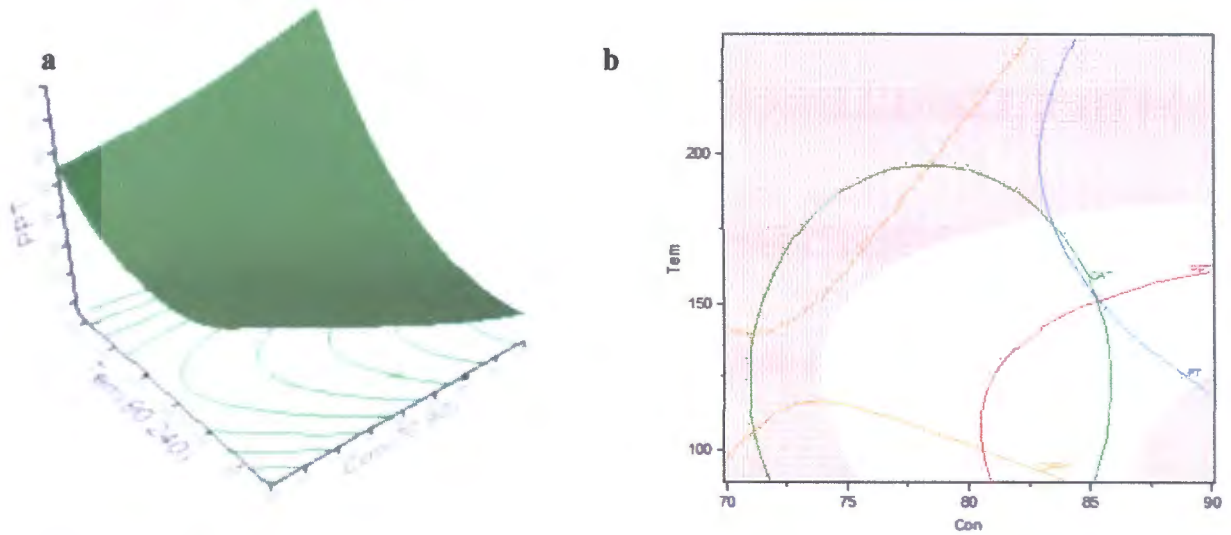


Figure 09 : Corrélation entre temps et concentration pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

III. Résultats et Discussion

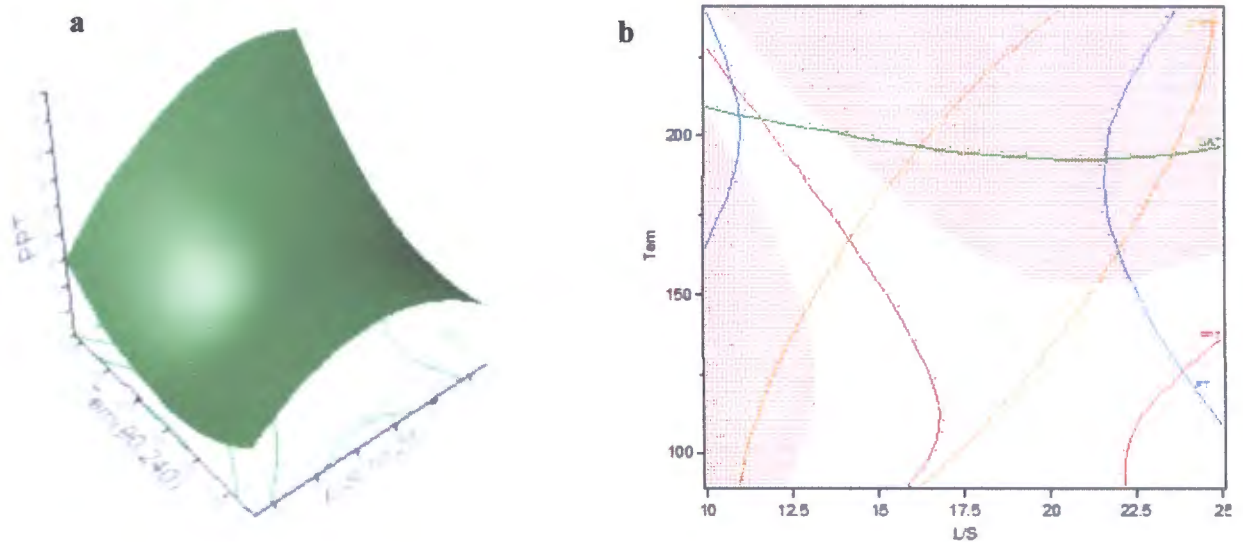


Figure 10 : Corrélation entre temps et rapport L/S pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

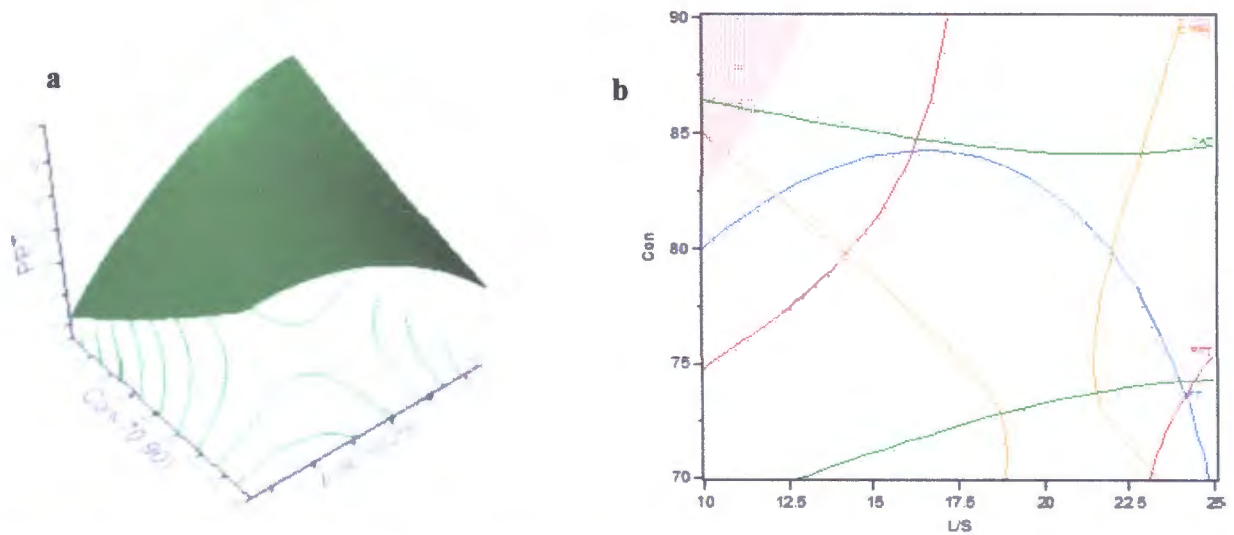


Figure 11 : Corrélation entre concentration et rapport L/S pour le taux des polyphénols totaux (mgEAG/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

Selon les figures 06, 07, 08, 09, 10 et 11, on observe l'augmentation du taux des polyphénols en augmentant la température et le temps de macération ainsi que le rapport L/S, tandis que le taux des polyphénols diminue avec l'augmentation de la concentration du méthanol (effet négatif). Une équation de second ordre a été utilisée pour corréler les variables du processus avec les réponses. Les coefficients du second ordre polynomiaux ont été déterminés en utilisant la régression multiple.

III. Résultats et Discussion

$$Y_1 = 28.94 + 1.61X_1 + 3.54X_2 - 1.50X_3 + 2.51X_4 + 0.37X_1X_2 + 0.06X_1X_3 + 1.90X_2X_3 - 0.38X_1X_4 + 1.51X_2X_4 + 5.08X_3X_4 - 3.79X_1^2 + 2.41X_2^2 + 0.31X_3^2 - 2.40X_4^2.$$

Les valeurs optimales des différents facteurs ont été obtenues après la résolution de l'équation. Les conditions optimales de l'extraction des polyphénols estimées par l'équation du modèle sont groupées dans le tableau 06.

Tableau 06 : Conditions optimales de l'extraction des PPT.

Variable	Valeur critique
Température (30,60)	46.898737
Temps (90,240)	79.248305
Concentration (70,90)	84.810669
Rapport L/S (10, 25)	22.461659

Le taux théorique des polyphénols totaux prévus sous ces conditions est de 27.48 mg EAG/gMS.

III.2.2.3. Validation du modèle

Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions théoriques optimales ont été appliquées. Le taux des polyphénols obtenu sous ces conditions est de 26.80 mgEAG/gMS, c'est approximativement 95.53% de la valeur prévue. Ces résultats obtenus confirment la validité du modèle de CCD à précision uniforme et montrent aussi que l'équation du modèle est satisfaisante et fiable.

III.2.3. Résultats de l'optimisation de l'extraction de l'activité antioxydante totale

Les changements de l'activité antioxydante totale sont expliqués dans le tableau 03. D'après ce tableau, on constate que la valeur maximale de l'activité antioxydante totale est de 324.75 mg EAA/ gMS, obtenue en utilisant 17.5 ml/g du méthanol à 100% pendant 165 min à 45°C, alors que la valeur minimale est de l'ordre de 16 mgEAA/gMS obtenue en utilisant 10 ml/g du méthanol à 70% pendant 90 min à 30°C.

III.2.3.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire

La corrélation entre les teneurs réelles et prévues de l'activité antioxydante totale est estimée par le coefficient de détermination (R^2) déterminé par le test ANOVA et est représentée par la figure 02 (*Annexe II*).



III. Résultats et Discussion

L'utilisation du test ANOVA, nous a permis de constater qu'il y a une corrélation hautement significative ($p < 0.0025$) avec un coefficient de corrélation de 0.82, ceci montre que le modèle peut expliquer et prédire 82% de nos résultats (tableau 07).

Tableau 07 : Résultats de l'analyse de la variance pour le taux de l'activité antioxydante totale.

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	14	108563.97	7754.57	4.7266
Résidus	15	24609.19	1640.61	Prob > F
Total	29	133173.16		0.0025

III.2.3.2. L'analyse de l'influence et de l'interaction des facteurs

Cette analyse est réalisée en utilisant le test ANOVA pour les facteurs linéaires, de synergie et quadratiques. Les résultats de l'analyse sont consignés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Analyse de régression des résultats obtenus pour l'activité antioxydante totale.

Variable	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	151	16.53588	9.13	<.0001***
Température (30,60)	26.615	8.267941	3.22	0.0057**
Temps(90,240)	17.66	8.267941	2.14	0.0496*
Concentration %(70,90)	8.475	8.267941	1.03	0.3216
Rapport L/S (10,25)	6.8291667	8.267941	0.83	0.4218
T*Tem	-10.7225	10.12612	-1.06	0.3064
T°*Con	-51.4	10.12612	-5.08	0.0001***
Tem*Con	0.15	10.12612	0.01	0.9884
T°*L/S	3.50625	10.12612	0.35	0.7340
Tem*L/S	-8.00625	10.12612	-0.79	0.4415
Con*L/S	-5.43375	10.12612	-0.54	0.5994
T°*T°	-12.76917	7.733951	-1.65	0.1195
Tem*Tem	15.630833	7.733951	2.02	0.0615*
Con*Con	27.418333	7.733951	3.55	0.0029**
L/S*L/S	-4.081667	7.733951	-0.53	0.6054

(*) Effet significatif ($P < 0.05$). (**) Effet hautement significatif ($P < 0.01$). (***) Effet très hautement significatif ($P < 0.001$).

III. Résultats et Discussion

Selon le tableau 08, on observe que la variable linéaire « Température » exerce un effet hautement significatif ($p = 0.0057$) sur l'activité antioxydante totale de l'extrait, cependant le « temps » a une influence significative sur cette réponse ($p < 0,05$). De plus cette dernière est très hautement influencée par une variable d'interaction (Température*Concentration du méthanol) ($p=0.0001$). D'autre part, les variable quadratiques (Temps*Temps) et (Concentration*Concentration) présentent des effets significatif ($p=0.0615$) et hautement significatif ($p=0.0029$) respectivement. L'interaction entre les différents facteurs étudiés est représentée sous forme des surfaces de réponse et les contours profiler dans les figures 12, 13, 14, 15, 16 et 17.

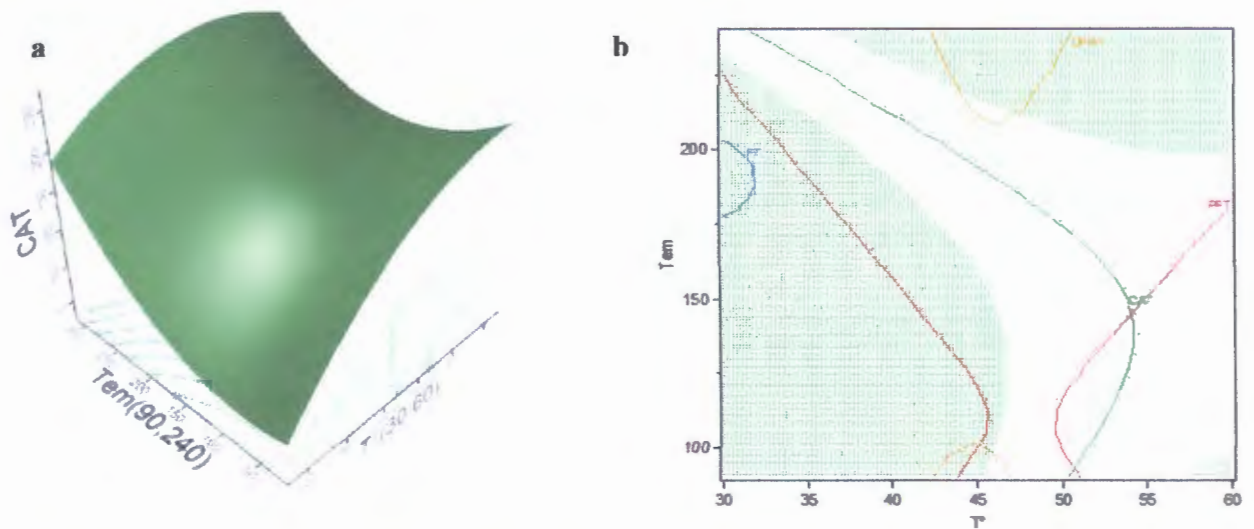


Figure 12 : Corrélation entre temps et température pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

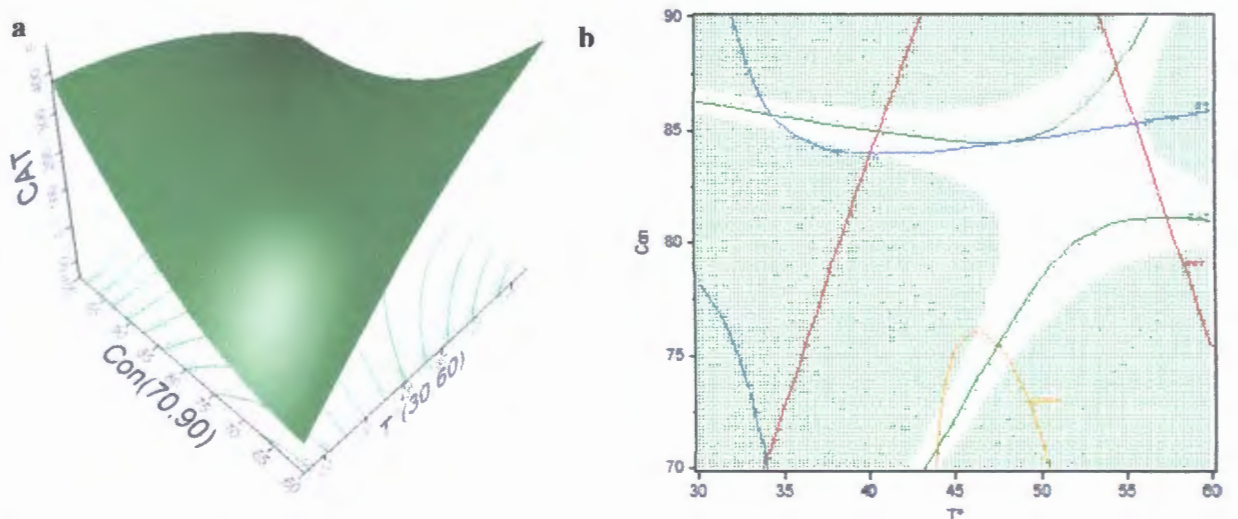


Figure 13 : Corrélation entre concentration et température pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

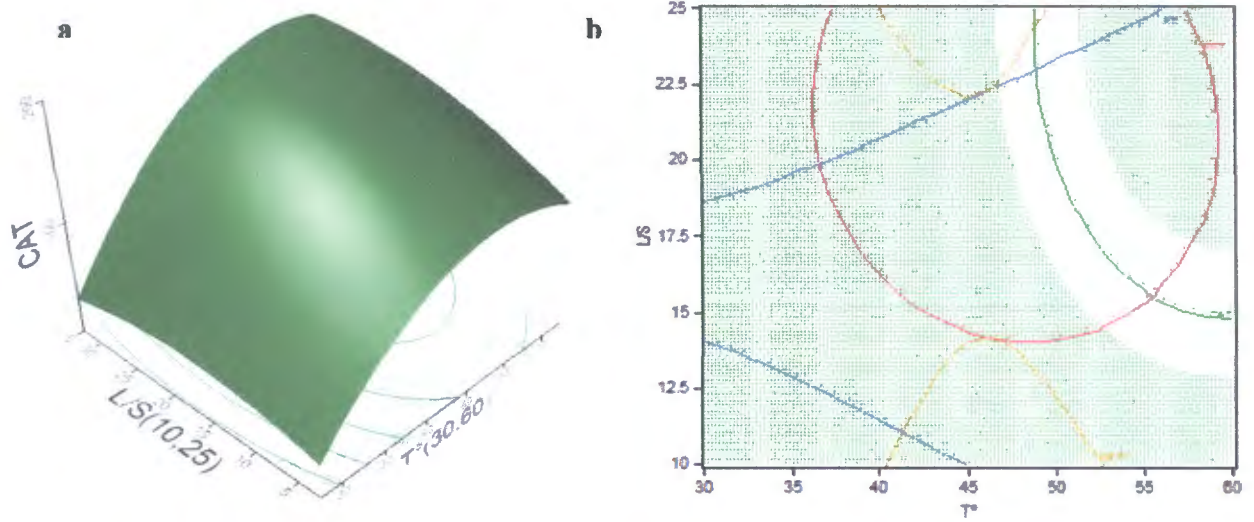


Figure 14 : Corrélation entre rapport L/S et température pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

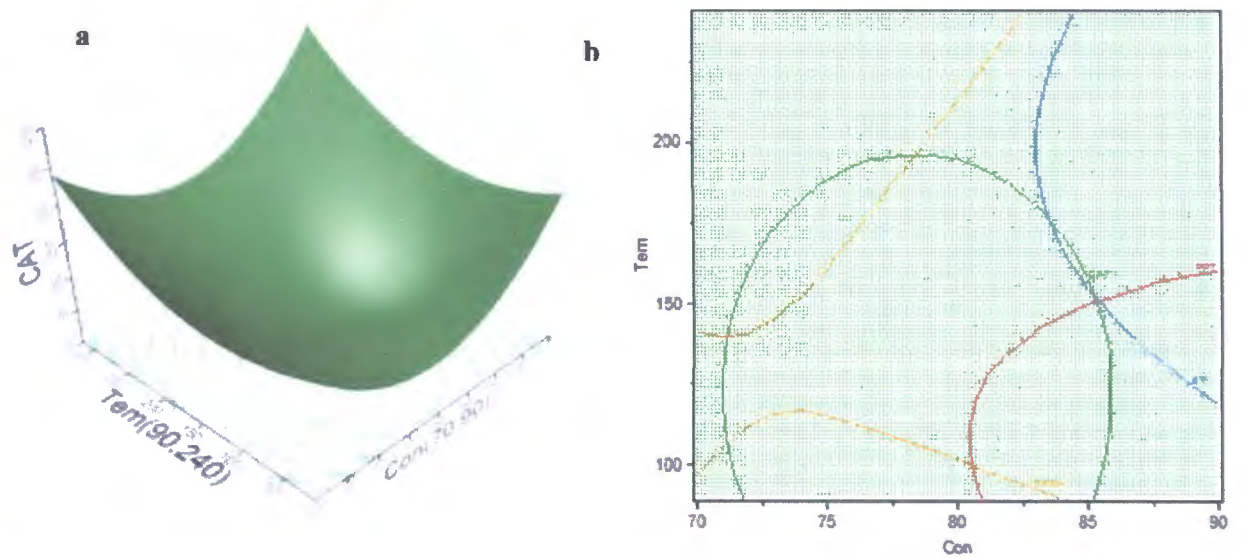


Figure 15 : Corrélation entre temps et concentration pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

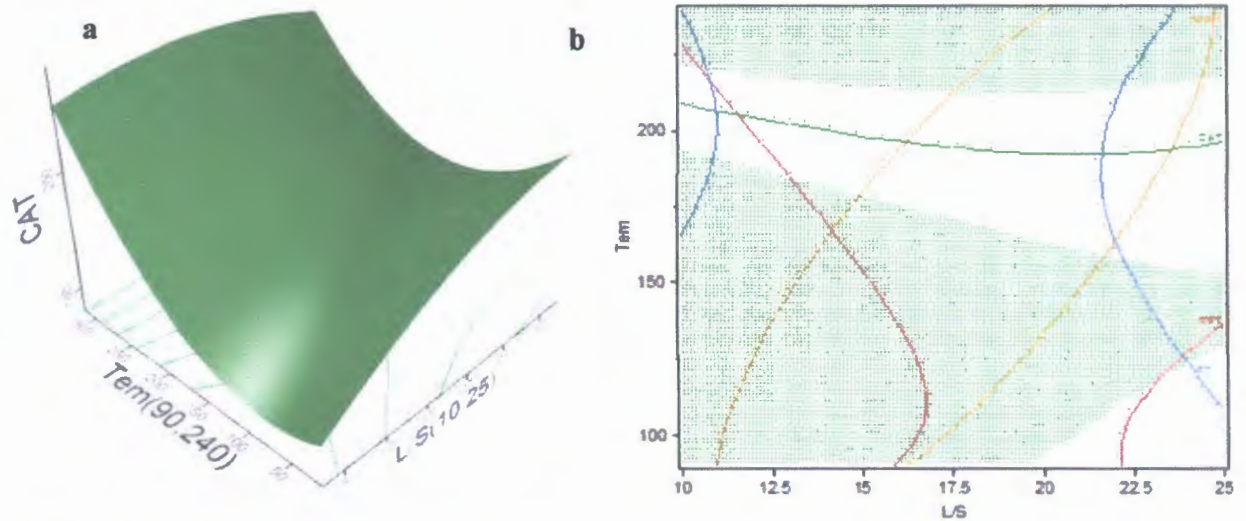


Figure 16 : Corrélation entre temps et rapport L/S pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

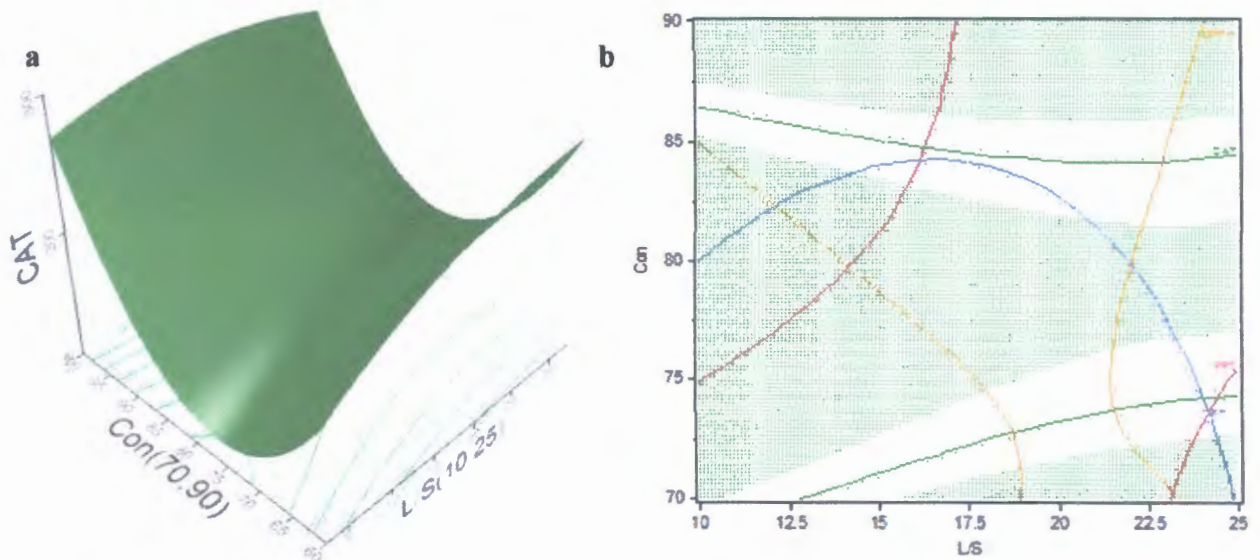


Figure 17 : Corrélation entre concentration et rapport L/S pour l'activité antioxydante totale (CAT) (mgEAA/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

L'équation du second degré du model quadratique polynomial, résume les différents effets des variables indépendantes sur l'activité antioxydante :

$$Y_2 = 151 + 26.61X_1 + 17.66X_2 + 8.47X_3 + 6.82X_4 - 10.72X_1X_2 - 51.4 X_1X_3 + 0.15X_2X_3 + 3.50X_1X_4 - 8.00 X_2X_4 - 5.43X_3X_4 - 12.76X_1^2 + 15.63 X_2^2 + 27.41 X_3^2 - 4.08X_4^2.$$

D'après cette équation, on constate que tous les facteurs linéaires ont un effet positif sur la valeur de l'activité antioxydante totale, en effet, cette dernière augmente avec l'augmentation de ces variables séparément. Par ailleurs, l'interaction de la température (X1) et le temps (X2) d'une part,

III. Résultats et Discussion

et la température (X1) et la concentration du méthanol (X3) d'autre part, exercent un effet négatif sur la réponse.

Après résolution de l'équation, on a obtenu les valeurs optimales pour chaque variable indépendante ainsi que la valeur optimale de l'activité antioxydante totale (tableau 09).

Tableau 09 : Conditions optimales de l'extraction de l'activité antioxydante totale.

Variable	Valeur critique
T°(30,60)	52.077739
Tem(90,240)	152.78141
Con(70,90)	83.818009
L/S(10,25)	24.586546

La valeur prévue de l'activité antioxydante totale sous ces conditions est de 160.68 mg EAA/gMS.

III.2.3.3. Validation du modèle

Pour valider le model, une extraction de l'activité antioxydante totale a été réalisée en utilisant les valeurs obtenues par la résolution de l'équation. Après le test de l'activité antioxydante, on a obtenu une valeur de 153.5 mgEAA/ gMS, c'est approximativement 97,53%. Ce qui confirme le bon ajustement du model et la reproductibilité de l'optimisation et donc des résultats.

III.2.4. Résultats de l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes

Les niveaux des facteurs, les valeurs mesurées et prédites des flavonoïdes sont représentés dans le tableau 03. Les résultats de la matrice d'expérience obtenus montrent que la teneur en flavonoïdes varie de 2.5 mg EQ/gMS à 50.71 mg EQ/gMS. La plus faible concentration a été obtenue après une extraction à 45°C pendant 165 min en utilisant 32.5 ml/g du méthanol à 80°. Cependant la valeur de 50.71 mg EQ/gMS a été obtenue avec une température de 60°C, un temps de 90 min et en utilisant 10 ml du solvant à 70°. De plus, il ressort des données du tableau 03, que les valeurs expérimentales et les valeurs prédites sont étroitement rapprochées.

III.2.4.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire

Le coefficient de détermination était très hautement significatif ($p < 0.0001$), ce qui renseigne sur la qualité du modèle et que le modèle est adapté à une utilisation dans cette expérience.

III. Résultats et Discussion

La valeur de R^2 était 0,92, ce qui signifie que la plupart des variations (> 92%) de la teneur en flavonoïdes pourrait être prédit par le modèle, alors que seulement 8% des variations ne peuvent pas être expliquées. La bonne corrélation existante entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales montre que le plan utilisé pour cette étude d'optimisation est appliqué avec succès dans le domaine expérimental choisi. Les résultats de l'analyse de la variance et de la régression sont résumés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Résultats de l'analyse de la variance pour le taux des flavonoïdes

Source	Degré (s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	14	3040.4815	217.177	11.9266
Résidus	15	273.1430	18.210	Prob > F
Total	29	3313.6246		<.0001

III.2.4.2. L'analyse de l'influence et de l'interaction des facteurs

Après l'étude de l'analyse de la variance concernant le taux des flavonoïdes, l'influence des différents facteurs sur la réponse a été examinée. Les effets de quatre facteurs ainsi que leurs interactions sur les réponses sont résumées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Analyse de la régression des résultats obtenus pour le taux des flavonoïdes.

Variable	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	21.24	1.742103	12.19	<.0001
Température (30,60)	3.5925	0.871051	4.12	0.0009***
Temps(90,240)	-2.59	0.871051	-2.97	0.0095**
Concentration %(70,90)	-5.314167	0.871051	-6.10	<.0001***
Rapport L/S (10,25)	-1.6125	0.871051	-1.85	0.0839
T*Tem	-0.1925	1.066816	-0.18	0.8592
T°*Con	-6.8125	1.066816	-6.39	<.0001***
Tem*Con	-1.6025	1.066816	-1.50	0.1538
T°*L/S	-0.44875	1.066816	-0.42	0.6800
Tem*L/S	0.94125	1.066816	0.88	0.3915
Con*L/S	1.36625	1.066816	1.28	0.2198
T°*T°	1.4933333	0.814794	1.83	0.0868
Tem*Tem	3.5020833	0.814794	4.30	0.0006***

III. Résultats et Discussion

Variable	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Con*Con	-0.944167	0.814794	-1.16	0.2647
L/S*L/S	-3.975417	0.814794	-4.88	0.0002***

(*) Effet significatif (P<0.05). (**) Effet hautement significatif (P<0.01). (***) Effet très hautement significatif (P<0.001).

Les résultats du tableau 14, montrent que les deux facteurs linéaires (température et concentration du solvant), le facteur de son interaction (T°*Con) et les facteurs quadratiques (T°*T°) et (L/S*L/S) exercent des effets très hautement significatifs (P<0.001) sur le taux des flavonoïdes extrait, en outre, le facteur linéaire « temps » a un effet hautement significatif.

Les surfaces de réponses et les contours profiler pour le taux des flavonoïdes sont représentés par les figures 18, 19, 20, 21, 22 et 23.

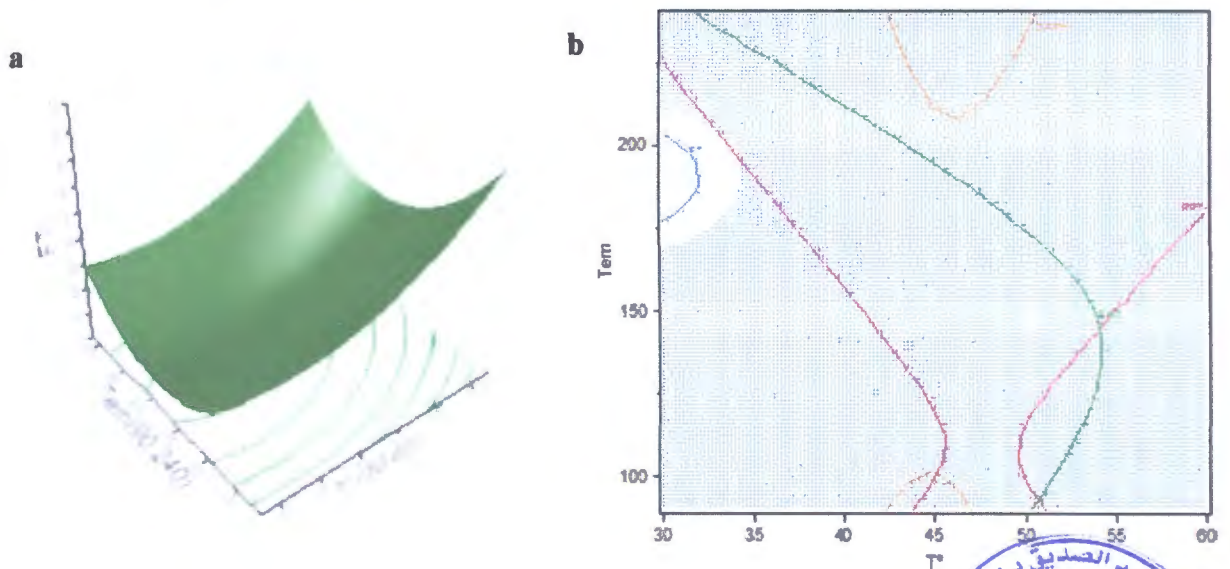


Figure 18 : Corrélation entre temps et température pour le taux des flavonoïdes (mgEQ/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.



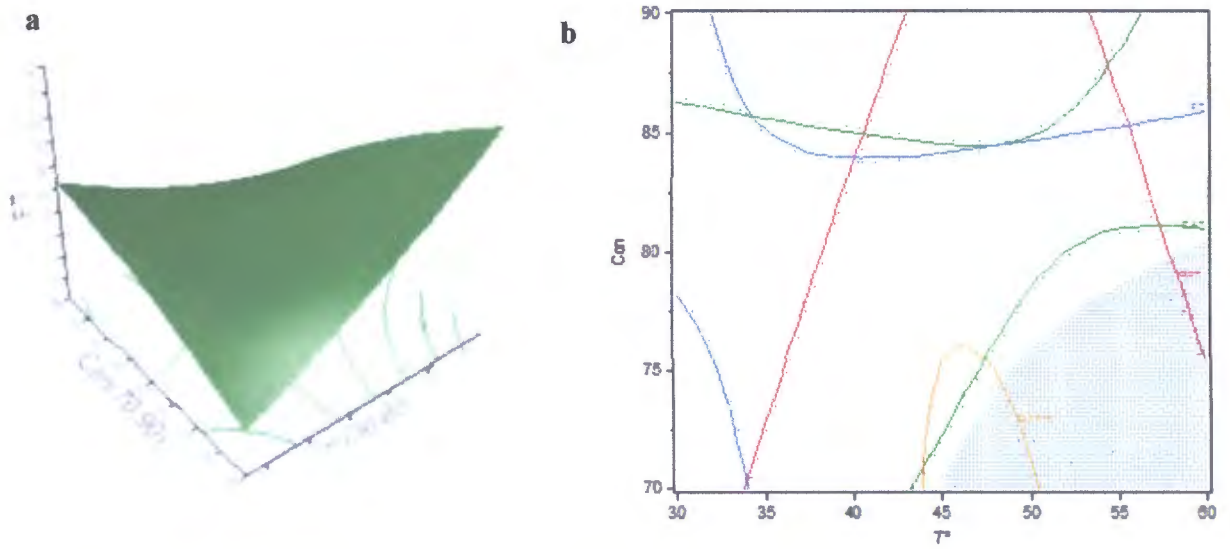


Figure 19 : Corrélation entre concentration et température pour le taux des flavonoïdes (mgEQ/gMS). (a):Surface de réponse (b): contour profiler.

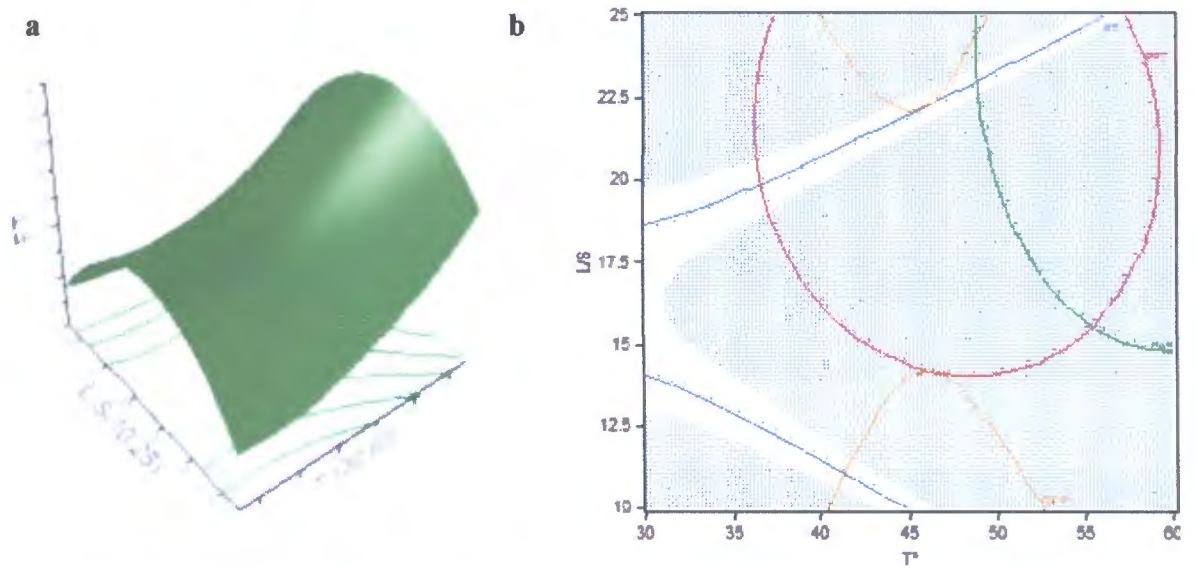


Figure 20 : Corrélation entre rapport L/S et température pour le taux des flavonoïdes (mgEQ/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

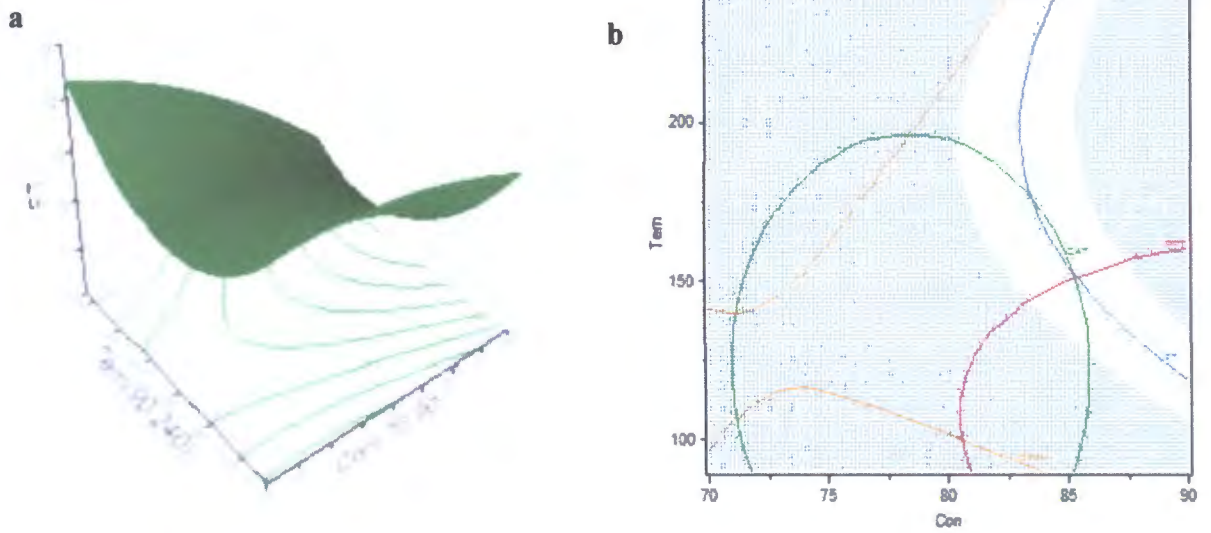


Figure 21 : Corrélation entre temps et concentration pour le taux des flavonoïdes (mgEQ/gMS).
(a): Surface de réponse (b): contour profiler.

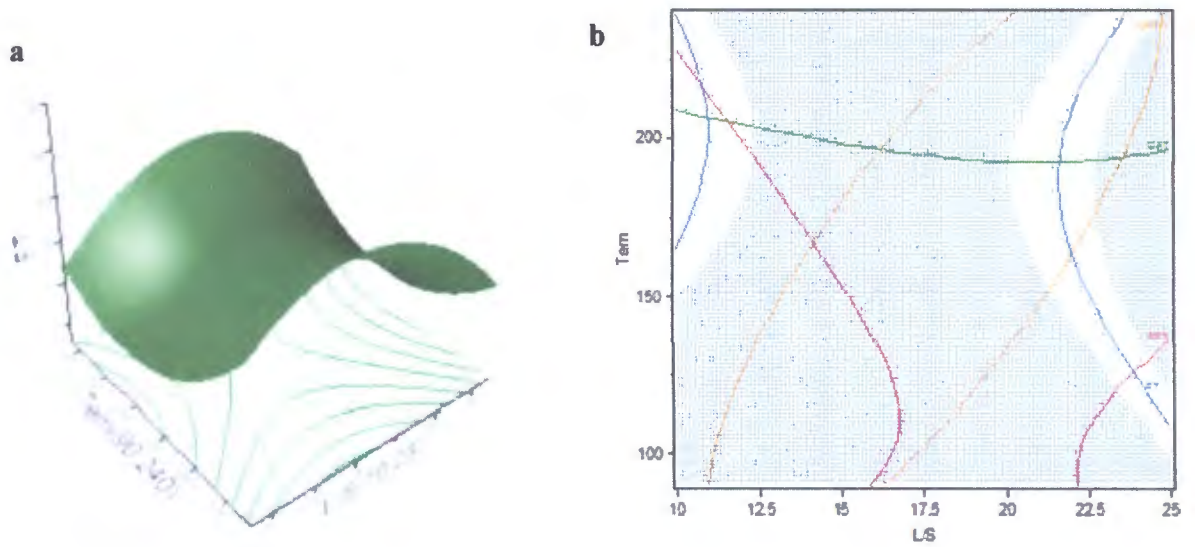


Figure 22 : Corrélation entre temps et rapport L/S pour le taux des flavonoïdes (mgEQ/gMS).
(a): Surface de réponse (b): contour profiler.

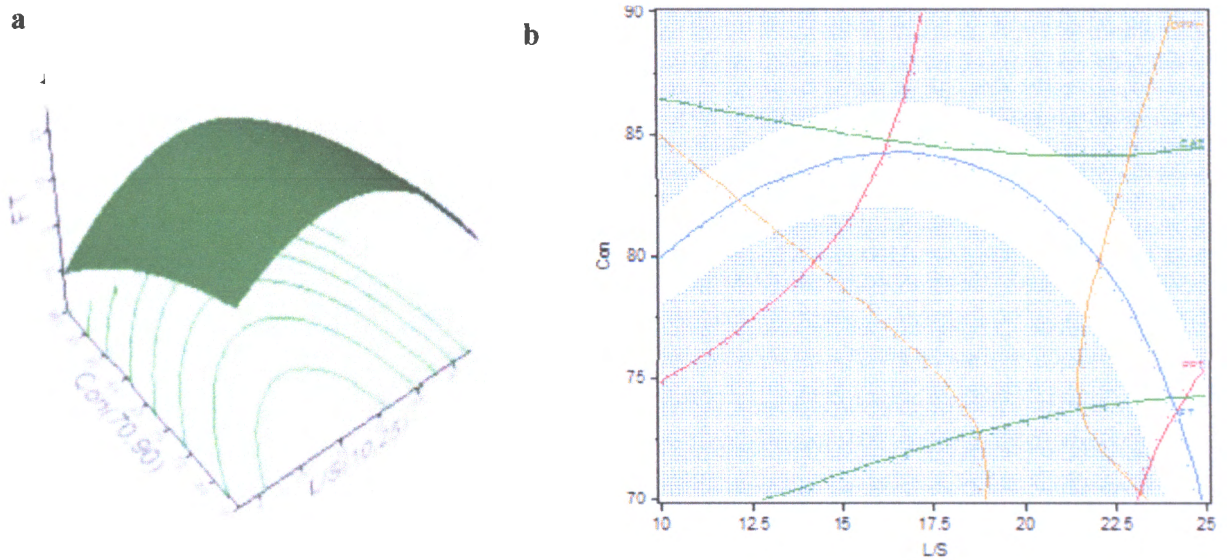


Figure 23 : Corrélation entre concentration et rapport L/S pour le taux des flavonoïdes (mgEQ/gMS). (a): Surface de réponse (b): contour profiler.

La transformation des surfaces de réponse en chiffre nous a donné l'équation suivante :

$$Y_3 = 21.24 + 3.59X_1 - 2.59 X_2 - 5.31X_3 - 1.61X_4 - 0.19 X_1X_2 - 6.81 X_1X_3 - 1.60 X_2X_3 - 0.44 X_1X_4 + 0.94 X_2X_4 + 1.36 X_3X_4 + 1.49 X_1^2 + 3.50 X_2^2 - 0.94 X_3^3 - 3.97 X_4^2.$$

L'analyse de surface de réponse et l'équation du model montre que tous les facteurs linéaires en exceptant la température (X1) ont un effet négatif sur la réponse, donc, le taux des flavonoïdes est en corrélation inversement proportionnelle avec ces facteurs. Ainsi, tous les facteurs d'interaction à l'exception de (Tem*L/S) et (Con*L/S) ont un effet négatif sur le taux des flavonoïdes.

La résolution de l'équation a donné la solution montrée dans le tableau 12.

Tableau 12 : Conditions optimales de l'extraction des flavonoïdes.

Variable	Valeur critique
T°(30,60)	31.197693
Tem(90,240)	193.73186
Con(70,90)	81.187172
L/S(10,25)	16.861578

La valeur prévue du taux des flavonoïdes donnée par le logiciel sous ces conditions est de 18.84 mgEQ/g MS.

III.2.4.3. Validation du modèle

L'application d'une extraction en respectant les niveaux des variables donnés par le modèle nous a permis d'avoir un extrait avec un taux des flavonoïdes de 18.57 mgEQ/ gMS. Cette valeur représente 98.57% de la valeur prévue par le logiciel, donc le modèle est validé et l'équation est satisfaisante.

III.2.5. Résultats de l'optimisation de la réduction du DPPH

Les résultats d'optimisation de la réduction du DPPH (valeur mesurée et valeur prévu) obtenus sont conciliés dans le tableau 03. D'après ce tableau, les pourcentages minimales et maximales de la réduction du DPPH (8.34% et 76.11% successivement) ont été obtenus en appliquant les conditions suivantes ; 15°C, 165 min, 80°, 17.5ml/g et 60°C, 240 min, 70°, 10ml/g respectivement. Les valeurs calculées sont globalement très similaires avec celles obtenues par le logiciel (prévues); ceci confirme et indique la haute significativité du modèle.

III.2.5.1. L'analyse du modèle par ANOVA et régression linéaire

Après l'utilisation du test ANOVA, une corrélation très hautement significative ($p < 0.0001$) a été établie entre les valeurs prévues et celles expérimentales avec un coefficient de corrélation de 0.93, ce qui reflète une harmonie entre les valeurs mesurées et celles prévues pour toute la régression. Autrement dit, la puissance d'explication du modèle du DPPH est de 93% et les 7% n'ont pas pu être expliqués par le modèle. Les résultats de l'analyse de la variance et de la régression sont représentés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Résultats de l'analyse de la variance pour la réduction du DPPH.

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	14	5716.8720	408.348	14.6086
Résidus	15	419.2878	27.953	Prob> F
Total	29	6136.1598		<.0001

III.2.5.2. L'analyse de l'influence et de l'interaction des facteurs

Les résultats de l'analyse de l'influence des variables indépendantes et l'influence de cette dernière sur la réduction du DPPH sont représentés dans le tableau 14.



Tableau 14 : Analyse de régression des résultats obtenus pour le taux du DPPH.

Variable	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	65.14	2.158414	30.18	<.0001***
Température (30,60)	1.1616667	1.079207	1.08	0.2988
Temps(90,240)	0.2616667	1.079207	0.24	0.8117
Concentration %(70,90)	-1.7675	1.079207	-1.64	0.1223
Rapport L/S (10,25)	-0.366667	1.079207	-0.34	0.7388
T*Tem	1.61875	1.321754	1.22	0.2396
T°*Con	-2.75	1.321754	-2.08	0.0550
Tem*Con	-1.24125	1.321754	-0.94	0.3626
T°*L/S	-1.475	1.321754	-1.12	0.2820
Tem*L/S	-2.76125	1.321754	-2.09	0.0542
Con*L/S	1.8975	1.321754	1.44	0.1716
T°*T°	-12.855	1.009506	-12.73	<.0001***
Tem*Tem	1.23625	1.009506	1.22	0.2396
Con*Con	-0.77125	1.009506	-0.76	0.4567
L/S*L/S	2.315	1.009506	2.29	0.0367*

(*) Effet significatif (P<0.05). (**) Effet hautement significatif (P<0.01). (***) Effet très hautement significatif (P<0.001).

D'après le tableau ci-dessus, il ressort que la réduction du DPPH est non influencée par les facteurs linéaires et d'interaction. Tandis que, le facteur quadratique « T°*T° » a un effet très hautement significatif, de plus l'autre facteur « L/S*L/S » exerce un effet significatif sur la réponse.

L'interaction entre les différents facteurs étudiés est représentée sous forme des surfaces de réponse et les contours profiler dans les figures 24, 25, 26, 27, 28 et 29.

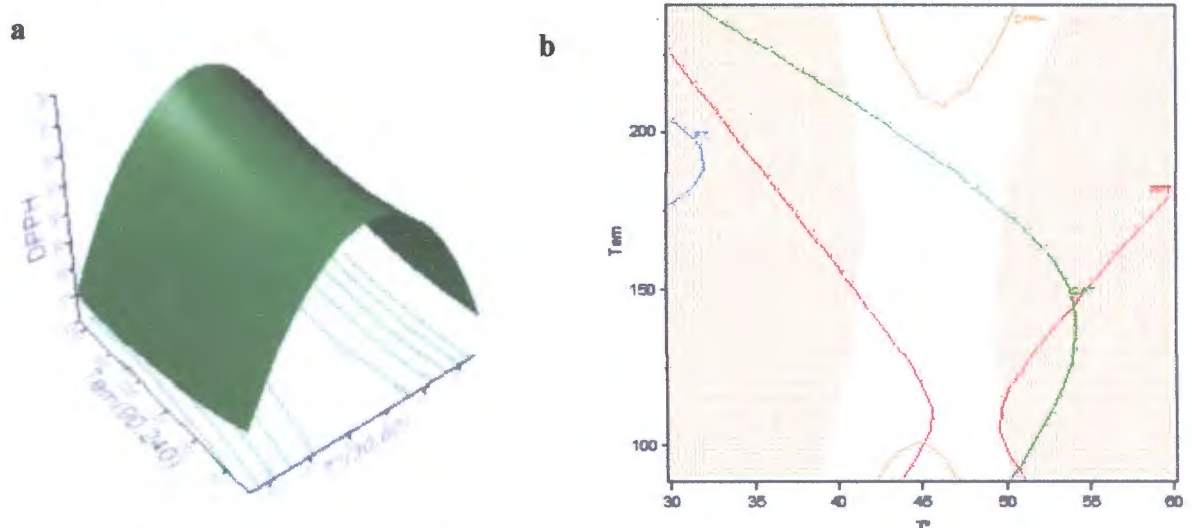


Figure 24 : Corrélation entre temps et température pour la réduction du DPPH.

(a): Surface de réponse (b): contour profiler.

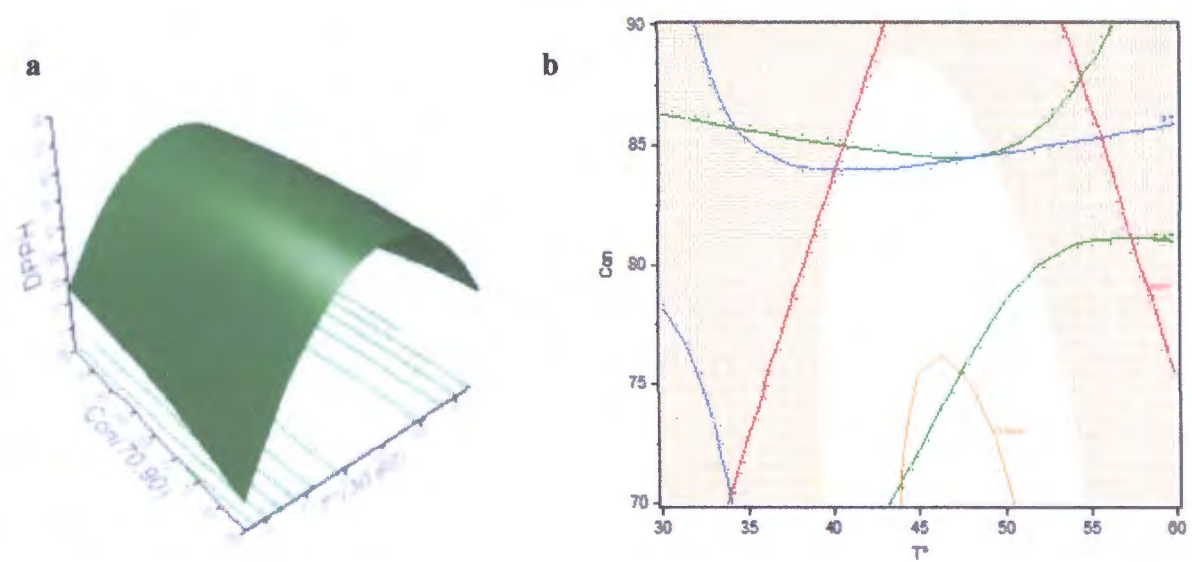


Figure 25 : Corrélation entre concentration et température pour la réduction du DPPH.

(a): Surface de réponse (b): contour profiler.

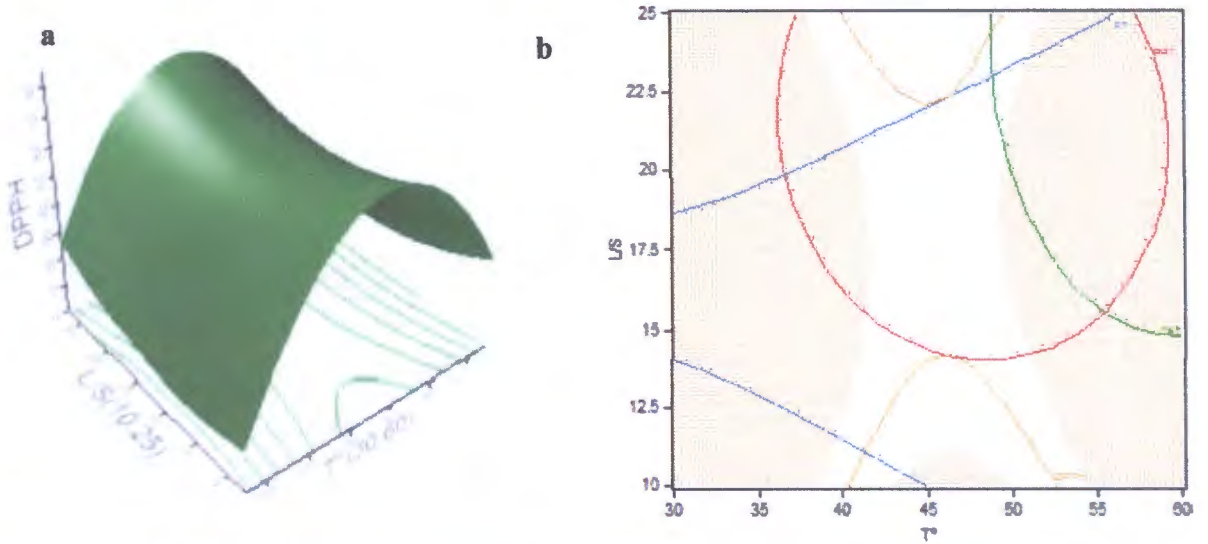


Figure 26 : Corrélation entre rapport L/S et température pour la réduction du DPPH.

(a): Surface de réponse (b): contour profiler.

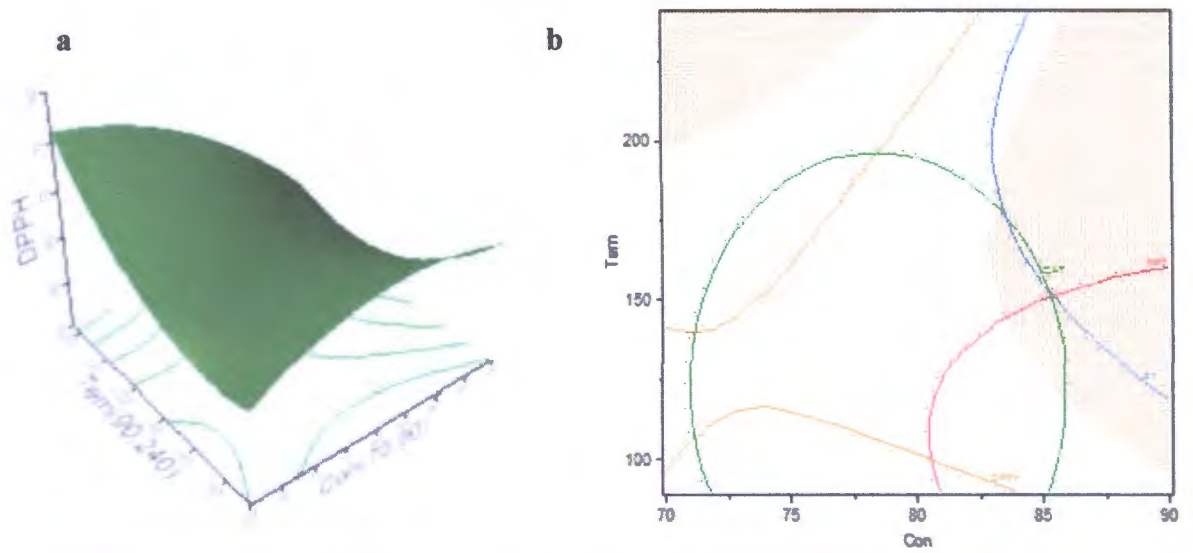


Figure 27 : Corrélation entre temps et concentration pour la réduction du DPPH.

(a): Surface de réponse (b): contour profiler.

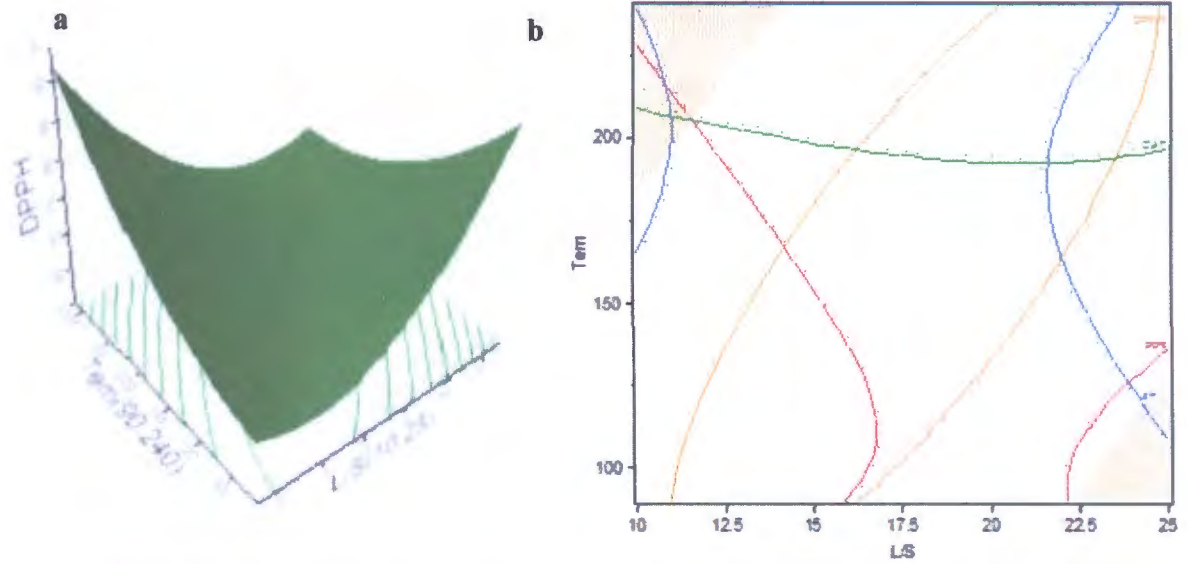


Figure 28 : Corrélation entre temps et rapport L/S pour la réduction du DPPH.

(a): Surface de réponse (b): contour profiler.

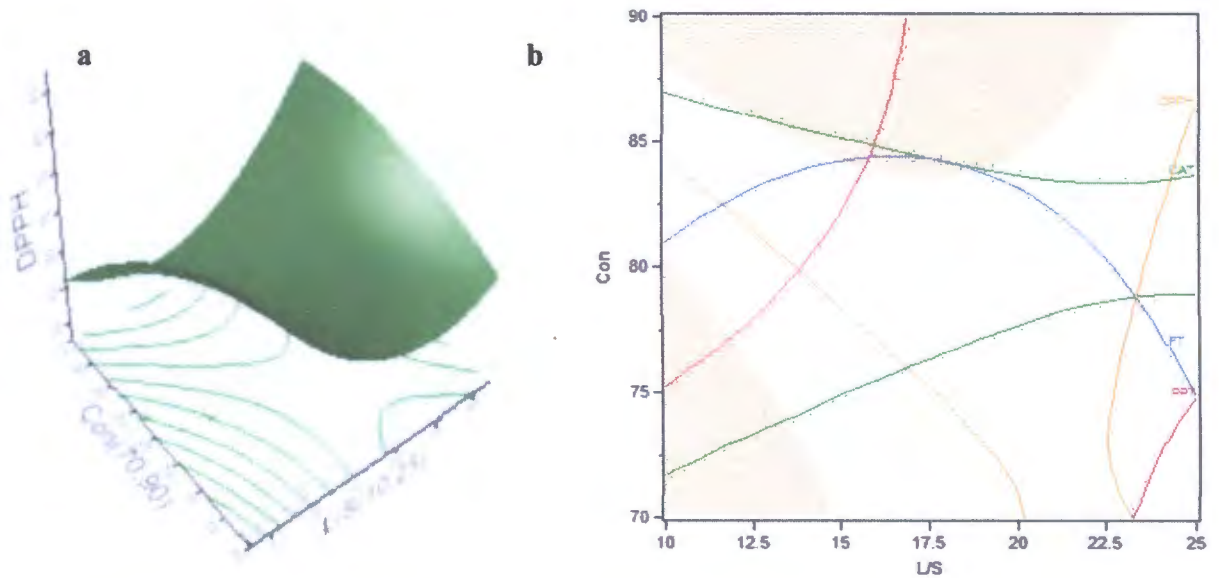


Figure 29 : Corrélation entre concentration et rapport L/S pour la réduction du DPPH.

(a): Surface de réponse (b): contour profiler.

L'équation du second degré du model quadratique polynomial, résume les différents effets des variables indépendantes sur la réduction du DPPH:

$$Y_4 = 65.14 + 1.16X_1 + 0.26 X_2 - 1.76X_3 - 0.36X_4 + 1.61 X_1X_2 - 2.75 X_1X_3 - 1.24 X_2X_3 - 1.47 X_1X_4 - 2.76 X_2X_4 + 1.89 X_3X_4 - 12.85 X_1^2 + 1.23 X_2^2 - 0.77 X_3^3 + 2.31 X_4^2.$$

III. Résultats et Discussion

Les facteurs linéaires « Température » et « Temps », les facteurs d'interaction « T°*Tem » et « Con*L/S » ont un effet positif sur la réduction du DPPH, autrement dit, cette dernière augmente avec l'augmentation de ces facteurs.

La résolution de l'équation nous a donné les valeurs optimales de chaque facteur (tableau 15) dont la valeur prévue de la réduction du DPPH sous ces conditions est de l'ordre de 65.79%.

Tableau 15: Conditions optimales de l'extraction du DPPH.

Variable	Valeur critique
T°(30,60)	46.449086
Tem(90,240)	146.89434
Con(70,90)	72.250336
L/S(10,25)	19.627001

III.2.5.3. Validation du modèle

Après l'extraction du DPPH en appliquant les conditions déjà optimisés par le model CCD. Un test de la réduction du DPPH a été réalisé. La valeur obtenue est 54.36%, c'est approximativement 82.62% de la valeur donnée par le logiciel, ce qui indique le bon fonctionnement du model.

III.3. Effet de différents facteurs sur les réponses étudiées

III.3.1. Effet de la température

L'efficacité d'extraction des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes, l'intensité de l'activité antioxydante totale et la réduction du DPPH des extraits de fruit d'arbousier sont significativement influencées par la température.

Une température d'extraction de 45°C était suffisante pour obtenir le meilleur rendement d'extraction des composés phénoliques totaux et la meilleure activité antioxydante totale, tandis que la température de 60°C favorise l'extraction des flavonoïdes et la réduction du DPPH.

La température est le paramètre principal qui influence les propriétés physico-chimiques du méthanol et des composés à extraire, elle a une grande influence sur le taux d'extraction, l'efficacité et la sélectivité (Kamali et al., 2016).

Pendant l'extraction à températures élevées, il est possible que la stabilité des composés puisse être affectée par la dégradation enzymatique. Galanakis et al. (2010) ont montré que le chauffage à

III. Résultats et Discussion

60 °C peut causer l'activation des enzymes endogènes ou bien les oxydases des polyphénols qui conduisent à l'oxydation des composés phénoliques. En outre, une élévation de la température d'extraction peut rompre la matrice phénolique et influence la structure de la membrane cellulaire la rendant moins sélective à cause de la coagulation des lipoprotéines. En plus, une très haute température détruit certains composés bioactifs y compris les polyphénols, les flavonoïdes, les polysaccharides et les sucres (Ju et al., 2003; Liyana-Pathirana et al., 2005).

Cependant Shi et al. (2003) ont rapporté que l'augmentation de la température favorise l'extraction en améliorant à la fois la solubilité du soluté et le coefficient de diffusion. Le chauffage pourrait ramollir le tissu végétal et affaiblir les interactions protéines-phénols et polysaccharides-phénols, donc augmente la migration des polyphénols de la matrice vers le solvant d'extraction.

III.3.2. Effet du temps

L'efficacité d'extraction des composés cibles dépend fortement de la durée d'extraction. Selon les résultats obtenus dans le tableau 03, il ressort que l'augmentation du temps d'extraction, augmente le rendement d'extraction des polyphénols totaux, l'activité antioxydante totale et la réduction du DPPH, par contre, l'augmentation du temps diminue le rendement d'extraction des flavonoïdes. Les résultats montrent également que les valeurs les plus élevées des quatre réponses ont été obtenues après un temps d'extraction de 315 min, 165 min, 90 min et 240 min pour les polyphénols totaux, l'activité antioxydante totale, les flavonoïdes et la réduction du DPPH respectivement.

Le temps d'extraction est un autre paramètre important qui influence l'extraction, ce paramètre est en relation avec plusieurs autres paramètres tels que la température d'extraction. Les résultats trouvés par Lekbir et al. (2013) ont montré que la quantité des composés phénoliques extraite à partir de dattes est maximale au bout de 6 heures.

Silva et al. (2007) ont rapporté que les composés bioactifs risquent de se dégrader pendant une longue durée d'extraction à température élevée.

III.3.3. Effet de la concentration du solvant

La concentration du solvant peut influencer de manière significative l'efficacité de l'extraction. Les résultats révèlent que l'augmentation de la concentration du solvant augmente la valeur de l'activité antioxydante totale, par contre, cette augmentation conduit à la diminution du rendement d'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes ainsi que la réduction du DPPH.

D'après la matrice d'expérience, il apparaît que la teneur la plus élevée en polyphénols totaux est obtenue avec le méthanol 80°. De même la meilleure valeur de l'activité antioxydante totale est

III. Résultats et Discussion

exprimée par l'extrait préparé par le méthanol 100°. En ce qui concerne les flavonoïdes et le DPPH, le rendement maximal d'extraction est obtenu par le méthanol 70°.

Selon **Xiao et al. (2008)**, l'eau conduit au gonflement de la matière végétale et augmente par conséquent la surface de contact entre les cellules et le solvant, ainsi ayant pour résultat l'augmentation de rendement d'extraction. Cependant, une meilleure extraction des composés bioactifs est obtenue en utilisant un mélange d'alcool et de l'eau au lieu de les utiliser séparément (**Markham, 1982**).

Selon **Telli et al. (2010)**, les combinaisons des solvants tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétone avec l'eau font améliorer l'extraction des composés phénoliques glycosylés.

III.3.4. Effet du rapport liquide/solide

Le rapport liquide/solide a également un effet sur le rendement d'extraction, l'augmentation du volume de solvant par rapport à la quantité de la matière végétale conduit à une meilleure extraction des polyphénols totaux et une meilleure activité antioxydante, tandis que, l'augmentation de la valeur de ce rapport défavorise l'extraction des flavonoïdes et la réduction du DPPH. En effet, lorsque le ratio entre le solvant et le solide est de 17.5 ml/g, le taux d'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante totale atteint le maximum ; 54.46 mg EAG/g MS et 324.75 mg EAA/g MS respectivement. En outre, la meilleure extraction des flavonoïdes et la meilleure réduction du DPPH sont obtenues quand le rapport liquide/solide est de l'ordre de 10 ml/g, elles sont respectivement de 50.71 mg EQ/g MS et 76.11%.

Les résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Bucic-Kojic et al. (2007)** dont le meilleur rendement d'extraction des polyphénols totaux à partir des graines de raisin a été trouvé lorsque le rapport liquide/solide le plus élevé (40/1 ; v/m) a été employé.

Un ratio liquide/ solide plus élevé est préféré lors d'une extraction des antioxydants à partir du matériel végétale, cela peut s'expliquer par le fait qu'un volume plus important du solvant permet une meilleure diffusion des composés antioxydants (**Prasad et al., 2012**).

Par ailleurs **Radojkovic et al. (2012)** ont expliqué l'effet de ce facteur en utilisant le principe de transfert de masse, dont la force d'entraînement des composés bioactifs est le gradient de la concentration entre le liquide et le solide, cette force devient plus élevée quand le rapport liquide/solide le plus élevé est appliqué.

III.4. Identification des antioxydants par HPLC

L'extrait optimal qui doit être utilisé dans le processus de la bio-conservation a été analysé afin d'obtenir une information sur sa composition en flavonoïdes et certains acides phénoliques en comparaison avec les différents étalons (*Annexe III*). Le chromatogramme de l'extrait optimal méthanolique de fruit d'*Arbutus unedo L.* est représenté par la figure 30.

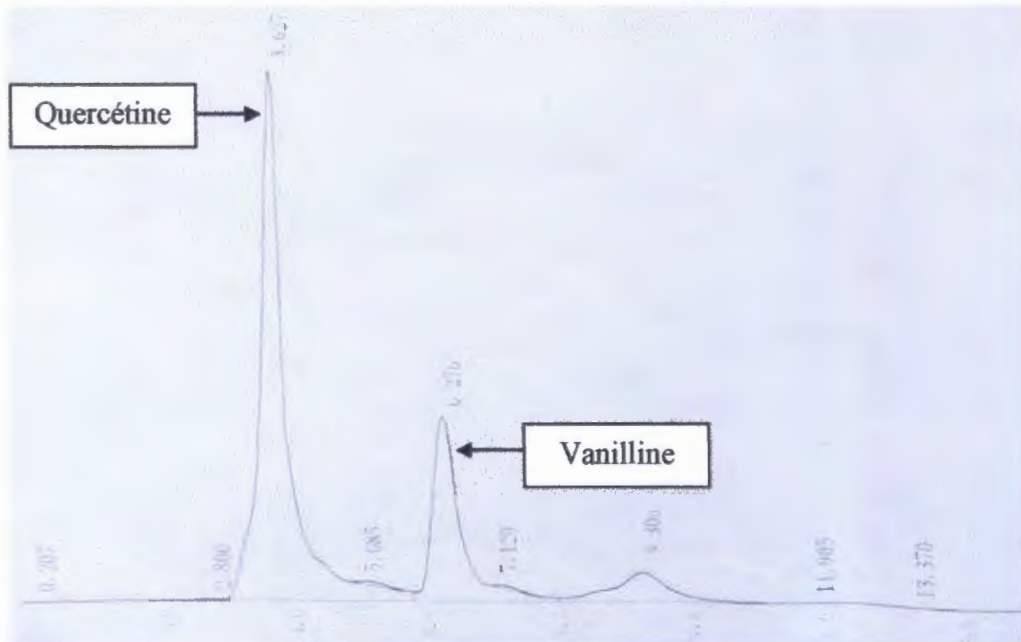


Figure 30 : Chromatogramme de l'extrait optimal des fruits rouges analysé par l'HPLC.

Sur le chromatogramme de l'extrait méthanolique, il apparaît deux principaux pics, dont les plus importants sont apparus après un temps de rétention de 3.627 min et 6.276 min, qui correspondent probablement à la quercétine et à la vanilline respectivement.

Selon **Ganhão et al. (2010)**, les composés phénoliques des fruits d'arbousier matures sont la catéchine, les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques, les flavonols, l'acide ellagique, les anthocyanines et les procyanidines.

III. 5. Utilisation d'extrait optimal dans le processus de la conservation du beurre

Après l'optimisation des quatre réponses étudiées et la validation du modèle pour chacune de ces réponses, les conditions optimales (temps (152.78 min), température (52.08°C), concentration du méthanol (83.82°) et ratio liquide/solide (24.59 ml/g)) qui nous ont donné l'optimum de l'activité antioxydante totale (153.5 mgEAA/ gMS) ont été appliqués pour préparer l'extrait utilisé dans la conservation du beurre pendant 15 jours.

III.5.1. Analyses physicochimiques du beurre pendant la bio conservation

III.5.1.1. Détermination de l'acidité

La répartition des valeurs d'acidité pour les échantillons du beurre est présentée dans la figure 31.

Les résultats montrent qu'au cours de la conservation, l'acidité augmente de $0.78 \pm 0.098\%$ à $1.41 \pm 0.0\%$ pour les témoins, et de $1.69 \pm 0.197\%$ à $1.83 \pm 0.0\%$ pour les échantillons à extraits. L'acidité renseigne sur le niveau de la lipolyse dans le produit et l'activité microbienne, elle constitue un critère de qualité pour le beurre.

Les résultats du test **Student** montrent que la différence entre l'acidité des témoins et celles des échantillons pendant la conservation est hautement significative ($p=0.009 < 0.01$).

L'ajout de l'extrait d'*Arbutus unedo* L. est à l'origine de l'augmentation de l'acidité dès le premier jour du stockage. Par ailleurs, on a constaté que l'augmentation de l'acidité des témoins est plus importante que celle des échantillons, ce qui explique l'effet antioxydant de notre extrait qui a ralenti l'hydrolyse de la matière grasse.

L'intensité de l'hydrolyse de la matière grasse, est plus élevée d'un échantillon à l'autre. Cette augmentation est le témoin d'une forte lipolyse. Au cours de l'évolution de la matière grasse en fonction de la durée de conservation, les acides gras à courte chaîne sont plus facilement libérés et l'acide butyrique est préférentiellement hydrolysé (El-Marrakchi et al., 1986).

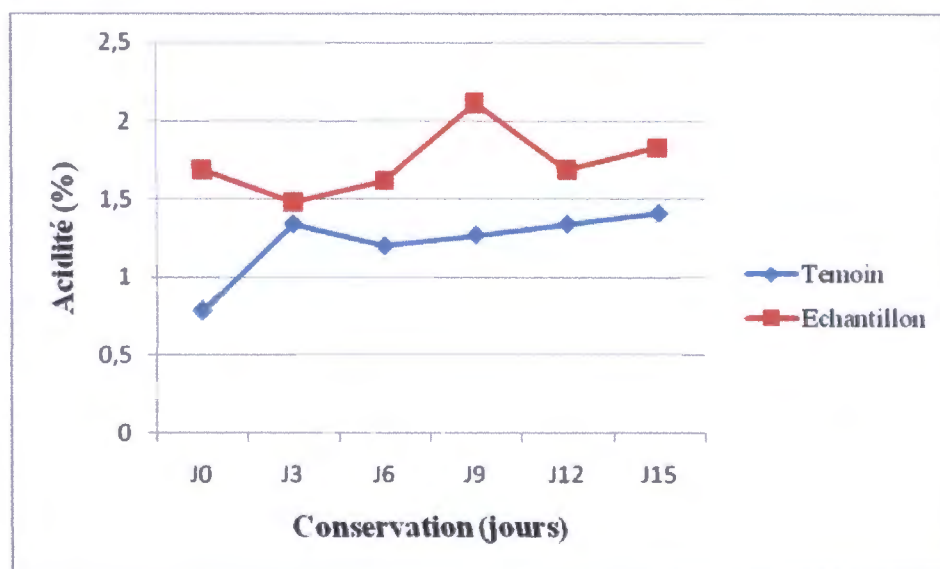


Figure 31: Variation de l'acidité du beurre au cours du stockage réfrigéré.

III.5.1.2. Détermination de l'indice d'acide

Les changements des valeurs d'indice d'acide pour les échantillons du beurre sont illustrés par la figure 32.

Le champ de variation d'indice d'acide pour nos échantillons du beurre pendant les 15 jours du stockage s'étend de $3,295 \pm 2,283$ à $19,280 \pm 0,098$ mg de KOH/ g pour les témoins et de $4,625 \pm 0,799$ à $20,615 \pm 0,388$ mg de KOH/ g pour les lots expérimentaux. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Rechak et al. (2008) qui ont rapporté les valeurs suivantes 17.39 mg de KOH/ g à 29.38 mg de KOH/ g.

La figure 32 montre une diminution d'indice d'acide au jour 12 des deux échantillons du beurre. On peut expliquer cet abaissement par la mauvaise manipulation. Cette figure montre également que l'indice d'acide de l'échantillon est supérieur à celui du témoin, ceci peut s'expliquer par l'acidité de l'extrait de fruit d'*Arbutus unedo* L. ajouté. Cependant, l'augmentation de l'indice d'acide pour les échantillons traités par l'extrait de fruit est moins importante que celle des témoins ce qui explique l'effet atténuatif de notre extrait sur l'hydrolyse de la matière lipidique.

Les résultats du test Student montrent que la différence entre l'indice d'acide des témoins et des échantillons durant le stockage réfrigéré est hautement significative ($p=0.004 < 0.01$)

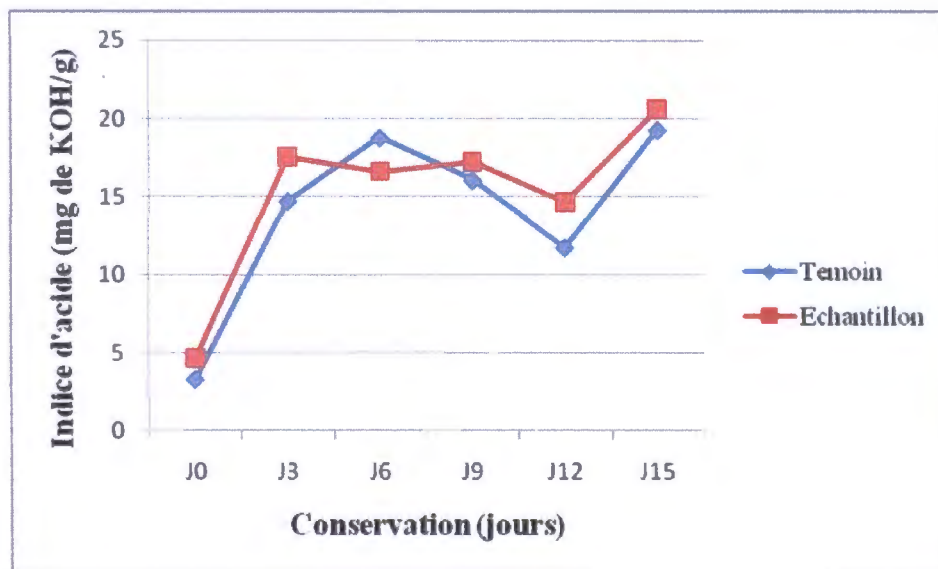


Figure 32 : Variation de l'indice d'acide du beurre au cours du stockage réfrigéré.

L'indice d'acide, nous renseigne sur le taux des acides gras libres existant dans le corp gras. Sa connaissance fournit des éléments utiles pour l'évaluation d'un état de détérioration éventuel des

corps gras et particulièrement de leur structure naturelle (triglycérides) suite à l'action d'une enzyme spécifique; la lipase (Chirrat et Mendel, 1997 ; Debbou et Chavana, 2003).

III.5.1.3. Détermination de l'indice de peroxyde

Les valeurs d'indice de peroxyde des échantillons étudiés sont illustrées par la figure 33.

En raison de l'importance de l'oxydation des matières grasses sur le plan nutritionnel et sensoriel, l'indice de peroxyde doit être contrôlé. Il donne une évaluation sur la qualité de peroxyde présent dans un corps, c'est ce qui indique en fait la quantité d'acide gras déjà rance (Deiana et al., 2002 ; Delmi-Bouras, 2004).

L'indice de peroxyde augmente légèrement après 15 jours de conservation de 0.175 ± 0.106 à 0.425 ± 0.035 meq d'O₂/kg et de 0.125 ± 0.035 à 0.250 ± 0.141 meq d'O₂/kg pour les témoins et les échantillons respectivement. L'augmentation de cet indice pour les échantillons reste moins intense comparativement à celui des témoins. Cette faible oxydation des échantillons s'explique par les conditions de conservation: entreposage à l'abri de l'air et de la lumière, et aussi bien par l'effet antioxydant de l'extrait permettant une bonne conservation des échantillons.

D'après ces résultats, on constate que les échantillons du beurre témoin présentent un indice de peroxyde proche de la norme Algérienne (journal officiel de la république Algérienne N° 96 (0.5 meqO₂/kg) contrairement à ceux avec extrait qui ont des valeurs inférieures à cette norme. Les résultats trouvés après l'analyse par le test **Student** montrent qu'il y a une différence hautement significative entre les échantillons et les témoins en ce qui concerne l'indice de peroxyde ($p=0.005 < 0.01$).

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a formation d'une faible quantité de peroxyde. Selon **Adrian et al. (1998)**, la formation de cette faible quantité de peroxyde signifie, soit que l'en se situe au premier stade d'oxydation, soit que celle-ci est tellement développée que les hydroperoxydes sont déjà décomposés et transformés.

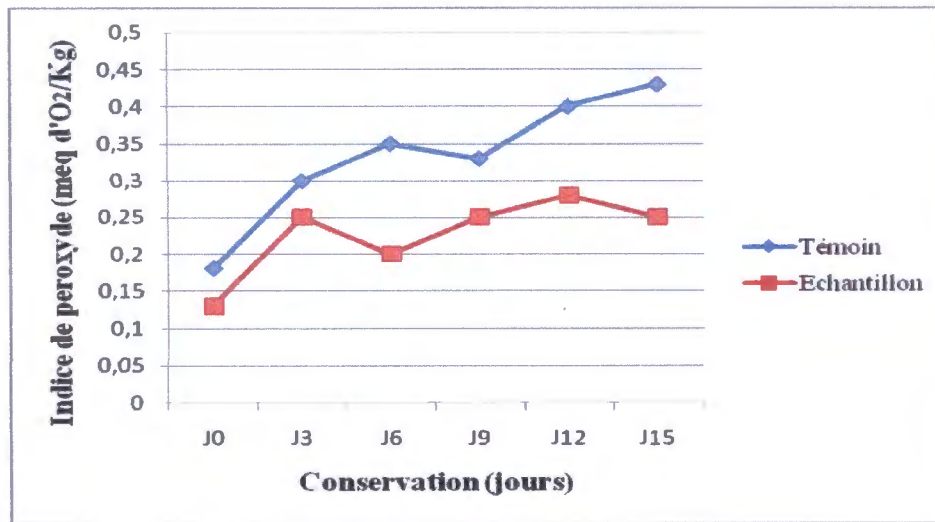


Figure 33 : Variation de l'indice de peroxyde du beurre au cours du stockage réfrigéré.

III.5.1.4. Détermination de l'indice de saponification

Cet indice nous a permis d'estimer la longueur moyenne de la chaîne des acides gras du beurre, puisque sa valeur est d'autant plus élevée que les acides gras sont de plus faible poids moléculaire (Adrian et al., 1998).

Selon les résultats présentés par la figure 34, on constate que les échantillons du beurre contiennent une forte teneur en acide gras à courte chaîne, vue sa valeur d'indice de saponification élevée, ces valeurs diminuent de $220,895 \pm 4,956$ mg de KOH/g à $216,940 \pm 7,297$ mg de KOH/g pour les témoins et de $227,905 \pm 10,910$ mg de KOH/g à $204,765 \pm 3,966$ mg de KOH/g pour les échantillons traités par l'extrait de fruit d'arbousier dont la diminution la plus importante est observée avec ces derniers ce qui confirme l'effet conservateur de notre extrait. Nos résultats suggèrent donc que les échantillons du beurre analysés au cours des 15 jours du stockage réfrigéré présentent une forte teneur en acides gras à courte chaîne. L'étude statistique par le test Student montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les échantillons et les témoins ($p=0.475$).

Selon Lecoq (1965), l'indice de saponification peut atteindre 220 à 232 mg de KOH/g pour la graisse du beurre industriel, il semble très proche de celui trouvé lors de cette étude.

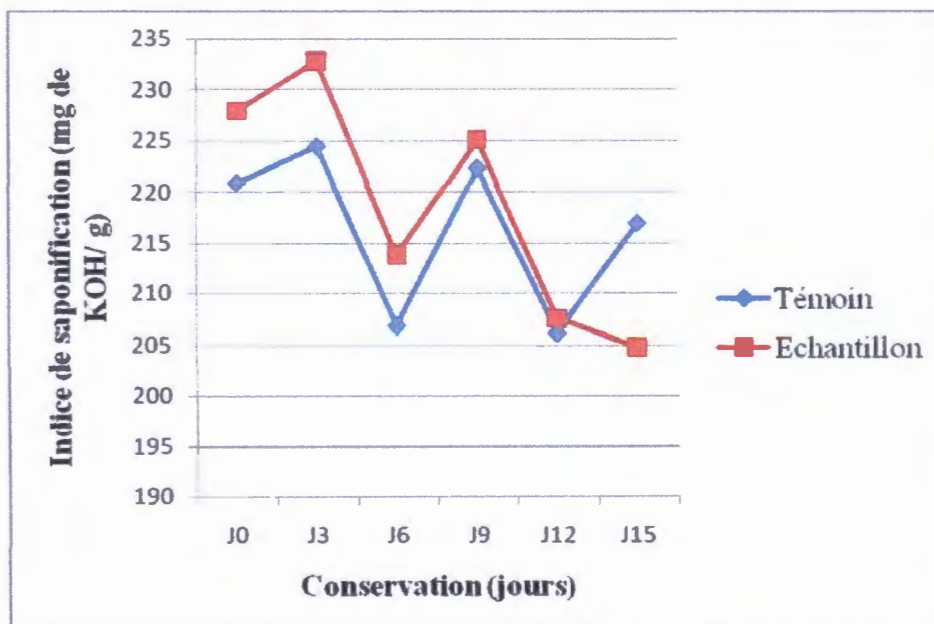


Figure 34 : Variation de l'indice de saponification du beurre au cours du stockage réfrigéré.

III.5.1.5. Détermination du pH

Les résultats concernant l'évolution du pH durant les 15 jours du stockage sont groupés dans la figure 35. Selon ces résultats, on remarque une diminution du pH des lots témoins de 6.690 ± 0.144 à 4.810 ± 0.0 . Cet abaissement du pH du produit témoin est dû à une fermentation importante au sein de ce dernier. Pour les échantillons traités par l'extrait, on observe également une diminution du pH dès le premier jour de conservation (5.300 ± 0.311) pour atteindre une valeur du pH de 4.30 ± 0.056 au 15^{ème} jour du stockage, cette diminution est moins importante que celle du témoin, cela peut être dû à l'effet d'extrait.

Les résultats d'analyse obtenus par le test **Student** montrent qu'il y a une différence significative entre les lots témoins et les échantillons traités ($p=0.048 < 0.05$).

Nos résultats sont légèrement proches à celles trouvés par **Idoui et al. (2010)**.

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion et Perspectives

Généralement, il est considéré que les conditions environnementales telles que la température, l'origine et la composition du beurre et les conditions du stockage etc., pourraient avoir une influence significative sur la composition physico-chimique de ce produit.

L'objectif de ce travail peut se résumer en deux parties : l'optimisation de l'extraction des substances bioactives de fruit d'*Arbutus unedo* L. par le modèle CCD-précision uniforme et l'étude de l'effet conservateur de l'extrait sur les critères physicochimiques du beurre traditionnel durant une période de stockage réfrigérée de quinze jours.

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes, de l'activité antioxydante totale et de la réduction du DPPH est affinée par la méthodologie de surface de réponses qui est appliquée sur une matrice ; échantillon de fruit d'*Arbutus unedo* L. Les modèles des teneurs en composés phénoliques, l'activité antioxydante totale, les flavonoïdes et la réduction du DPPH montrent des effets linéaires, quadratiques et d'interactions statistiquement significatifs avec les paramètres étudiés (concentration du méthanol, température, ratio liquide/solide et durée d'extraction).

Les modèles mathématiques établis ont permis d'obtenir des paramètres optimaux proches pour la concentration du solvant (84.81°, 83.81°, 81.18°, 72.25°) et pour le rapport L/S (22.46, 24.58, 16.86, 19.62 g/ml) mais sensiblement différents pour le temps et la température d'extraction (79.42, 152.78, 193.73, 146.89 min) (46.89, 52.07, 31.19, 46.44°C) respectivement.

L'étude de la validation, indique des données mathématiques pour les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes, l'activité antioxydante totale et la réduction du DPPH comparables aux valeurs expérimentales.

Les conditions d'extraction optimales ont été jugées ; concentration du méthanol 83.81°, le temps d'extraction de 152.78 minutes, le ratio solvant/échantillon de 24.58ml/g et la température d'extraction de 52.07°C. Dans ces conditions, la valeur expérimentale de l'activité antioxydante totale était 153.5mg EAA/gMS, qui est raisonnablement proche de la valeur prédite (160.68 mg EAA/gMS). L'extrait obtenu dans ces conditions a été utilisé dans le processus de la bioconservation du beurre.

Le suivi de l'évolution de la qualité physicochimique du beurre pendant quinze jours de conservation frigorifique a montré que l'ajout de l'extrait d'*Arbutus unedo* L. influe considérablement sur l'augmentation de l'acidité, de l'indice d'acide et de l'indice de peroxyde avec une différence hautement significative entre les échantillons du beurre traités par l'extrait de fruit et les témoins ($P < 0.01$) accompagnée d'une diminution légère du pH avec une signification

Conclusion et Perspectives

moins importante ($P < 0.05$). Les résultats montrent également que l'indice de saponification a tendance de diminuer progressivement le long du stockage.

L'ensemble des résultats obtenus nous permettent de dégager de nombreuses perspectives. Il serait souhaitable de :

- Analyser la composition chimique du beurre étudié pendant la conservation par GC-MS ;
- Analyse sensorielle pour étudier l'acceptabilité du beurre traité avec l'extrait de fruit d'arbousier par le consommateur.

Références
Bibliographiques

hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 52, p. 59-63.

Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M. et Velic, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng*, vol. 81(1), p. 236-242.

Burnie, G., Forrester, S., Greig, S., Guest, S., Harmony, M., Hobley, S., Jackson, G., Lavarack, P., Ledgett, M., McDonald, R., Macoboy, S., Molyneux, B., Moodie, D., Moore, J., Newman, D., North, T., Pienaar, K., Ryan, S., Schien, G. et Silk, J. (2005). *Botanica : Encyclopédie de botanique et d'horticulture*. Chine, p.106.

Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Wan Aida, W. M. et Ho, C. W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, vol.16, p. 203-213.

Chirrat, S. et Mendel, M. (1997). Contribution à la caractérisation physicochimique de deux variétés d'huiles d'olives locales Chamlal et Blanquette, p.6-72.

Chua, S. C., Tan, C. P., Mirhosseini, H., Lai, O. M., Long, K. et Baharin, B. S. (2009). Optimization of ultrasound extraction condition of phospholipids from palm-pressed fiber. *J. Food Eng*, vol. 92, p. 403-409.

Debbou, B. et Chavana, T. (2003). Extraction et caractéristiques biochimiques de l'huile d'argan. Mémoire de fin d'étude en Agronomie. *Institut National Agronomique (INA)*, p. 45-50.

Deiana, M., Rosa, A., Cao, C., Pirisi, F., Bandino, G. et Dessi, A. (2002). Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olives oils : importance of tocophérol concentration. *J. Agr. Food. Chemistry*, vol. 50, p. 4342-4346.

Delmi-Bouras, A. (2004). Biochimie alimentaire. *Office des Publications Universitaire*, p. 99-101.

Djenane, D. (2009). Les perspectives naturelles pour la préservation de la viande, *Revue Campus*, N°16, p. 28-61.

Doukani, K. et Tabak, S. (2014). ANTIBACTERIAL EFFECT OF *ARBUTUS UNEDO L.* FRUIT AND ITS ESSENTIAL OILS ON *SALMONELLA TYPHI* (ATCC 14028) AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* (ATCC 27853). *International Journal of Applied and Natural Sciences*, vol. 3(6), p. 25-30.

Doukani, K. et Tabak, S. (2014). Profil Physicochimique du fruit "Lendj" (*Arbutus unedo L.*). *Nature & Technology*, n°12, p. 53-66.

Duarte, A.C. et Capelo, S. (2006). Application of Chemometrics in Separation Science, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 29, p. 114-1176.

Dutka, M., Ditaranto, M. et TereseLøvås, T. (2015). Application of a Central Composite Design for the Study of NO_x Emission Performance of a Low NO_x Burner. *Energies*, vol. 8, p. 3606-3627.

El-Kalamouni, C. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Th. Doct. *Institut National Polytechnique*. Toulouse, p.115.

EL-Marrakchi, A., Berrada, M., Chahboun, M. et Benbouhou, M. (1986). Etude chimique du smen marocain. Département d'Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale (HIDAOA), Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202-Rabat-Instituts, Maroc. *Section de Technologie alimentaire du même Institut*, vol. 66 (2), p. 117-120.

Farag, R.S., El-Baroty, G.S. et Amany, M.B. (2003). The influence of phenolic extracts obtained from the olive plants (cvs. Picual and Kronakii) on the stability of sunflower oil. *Journal of Food Science and Technology*, vol.38, p.81-87.

Faucher, J. (2006). Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Th. Doct. *INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE*, Toulouse, p. 25-58.

Ferreira, S. L. C., Dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., Neto, B. B. et Bosque-Sendra, J. M. (2004). Doehlert matrix: achemometric tool for analytical chemistry—review. *Talanta*, vol. 63, p. 1061–1067.

Fonseca, D. F. S., Salvador, A. C., Santos, S. A. O. Vilela, C., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D. et Rocha, S. M. (2015). Bioactive Phytochemicals from Wild *Arbutus unedo* L. Berries from Different Locations in Portugal: Quantification of Lipophilic Components. *Mol Sci*, vol. 16(6), p. 14194–14209.

Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P. M., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R. B., et Santos, C. N. (2010). Antioxidant Properties and Neuroprotective Capacity of Strawberry Tree Fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, vol. 2, p. 214–229.

Galanakis, C.M., Tornberg, E. et Gekas, V. (2010). Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. *J. Chem. TechnolBiotechnol*, vol. 85 (8), p. 1148–1155.

Ganhão, R., Morcuende, D. et Estévez, M. (2010). Protein oxidation in emulsified cooked burger Patties with added fruit extarcts: Influence on colour and texture deterioration during chill

storage. *MeatSci*, vol. 85, p. 402–409.

Gertz, C., Klostermann, S. et Kochhar, S. P. (2000). Testing and comparing oxidative stability of vegetable oil and fats at frying temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol.102, p.543-551.

Gomes, M.F.F.N. (2011). Strategies for the improvement of *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree) : *In vitro* propagation, mycorrhization and diversity analysis. Ph. D. Thesis, *Universidade de Coimbra*, Coimbra, Portugal, p. 128- 130.

Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A. et Fernandez-Gutierrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, p.1220-1234.

Goupy, J. (1996). Stratégie de recherche, Définition et objectifs des méthodes des plans d'expériences, *Dunod*, Paris, France.

Goupy, J. (2000). Modélisation par les plans d'expériences. *Technique de l'ingénieur* R 275.

Goupy, J., (2005). Pratiquer les plans d'expériences. *Dunod*, Paris, France, p. 73.

Goupy, J. (2006). Les plans d'expériences. *Modulad*, N° 34, p.74 -116.

Goupy, J. et Creighton, L (2006). INTRODUCTION AUX PLANS D'EXPÉRIENCES.3^e éd. Paris : *Dunod* , p. 82-88.

Graille, J. (2003). Lipides et corps gras alimentaires. *Tec. Et Doc.* Lavoisier, p. 5, 6, 165-171.

Idoui, T., Benhamada, N. et Leghouchi, E. (2010). Microbial quality, physicochemical characteristics and fatty acid composition of a traditional butter produced from cows' milk in East Algeria. *Laboratory of Pharmacology and Phytochemistry, University of Jijel*, vol.61 (3), p. 232-236.

Isbilir, S.S., Orak, H.H., Yagar, H. et Ekinici, N. (2012). Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*arbutus unedo* l.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, vol.11(3), p. 223-237.

Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P. et Brulé, G. (2008). Science des aliments. Stabilisation biologique et physicochimique. *Tec et Doc. Lavoisier*, p. 8, 9, 65-83.

Journal officiel de la république Algérienne N° 96 de 5 Ramadhan 1419 correspondant au 23 décembre 1998, arrêté interministériel du 21 Chaabane 1419 correspondant 10/12/1998.

Spécification des techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation (Art : 3, Art : 7, Art : 8).

Ju, Zhi Yong, Howard et Luke, R., (2003). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J. Agric. Food Chem.* vol. 51 (18), p. 5207–5213.

Kamali, H., Khodaverdi, E., Hadizadeh, F. et Ghaziaskar, S.H. (2016). Optimization of phenolic and flavonoid content and antioxidants capacity of pressurized liquid extraction from *Dracocephalum kotschyviva* circumscribed central composite. *J. of Supercritical Fluids*, vol. 107, p. 307–314.

Kassama, L. S., Shi, J. et Mittal, G. S. (2008). Optimization of supercritical fluid extraction of Lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. *Sep. Purif. Technol.*, vol. 60, p. 278–284.

Kchaou, W., Abbès, F., Blecker, C., Attia, H. et Besbes, S. (2013). Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). *Industrial Crops and Products*, vol. 60, p. 262-269.

Koksoy, O. et Doganaksoy, N. (2003). Joint optimization of mean and standard deviation using response surface methods. *Journal of Quality Technology*, vol. 35, p.239.

Lecoq, R. (1965). Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. *Ed. Doin*, p. 1304-1311.

Lekbir, A., Alloui-Lombarkia, O., Mekentichi, S., Noui, Y. et Baississe, S. (2013). Optimization of Deglet-Nour date (*Phoenix dactylifera* L.) phenol extraction conditions. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, vol. 7(11), p. 693-696.

Lepadatu, D. (2006). OPTIMISATION DES PROCÉDES DE MISE EN FORME PAR APPROCHE COUPLÉE PLANS D'EXPERIENCES, ELEMENTS FINIS ET SURFACE DE REPONSE. Th. Doct. *Institut des Sciences et Techniques de l'Ingénieur d'Angers*, p. 64.

Lim, T. K. (2012). In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*; Springer: Dordrecht. The Netherlands; Heidelberg, Germany; London, UK; New York, NY, USA, p. 2, 444-451.

Linderschmidt, R., Trylka, A., Goad, M. et Witschi, H. (1986). The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology*, vol. 38, p. 151-160.

Liyana-Pathirana, Chandrika et Shahidi (2005). Fereidoon, optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem*, vol. 93 (1), p. 47–56.

Madhavi, D. L., Deshpande, S. S. et Salunkhe, D.K. (1995). "Toxicological aspects of food antioxidants." *Food antioxidants. Technological and Health perspectives*.

Makhloufi, A. (2013). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Th. Doct. *UNIVERSITE ABOUBAKER BELKAID*, Tlemcen, p. 67.

Males, Z ., Plazibat, M., Vundac, V. B. et Zuntar, I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree – *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*). *Acta Pharm*, vol. 56, p. 245–250.

Marini, R. (2006). Evaluation des différentes approches pour l'estimation de l'incertitude des Mesures analytiques. Th. Doct. *Université de Liège*.

Markham, K.R. (1982). Techniques of Flavonoid Identification. *Academic Press*, London.

Mendes, L. (2010). Estudo do efeito protector da folha e fruto da espécie *Arbutus unedo* L. nadanificação oxidativa em eritrócitos humanos, *Universidade Fernando Pessoa*, Porto.

Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. et Antunes, M. D. (2014). *Arbutus unedo* L.: Chemical and Biological Properties. *Molecules* , vol.19, p.15799-15823.

Molina, M., Pardo-de-Santayana, M., Aceituno, L., Morales, R. et Tardío, J. (2011). Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two Spanish forests. *Forestry*, Vol. 84, p. 419-429.

More, D. et White, J. (2005). Encyclopédie des arbres. *Flammarion*. Grande –Bretagne, p.753.

Mosele, J.I., Macià, A., Romero, M.P. et Motilva, M. J. (2016). Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under in vitro digestion and colonic fermentation. *Food Chem*, vol.201, p. 120-130.

Noordin, M.Y., Venkatesh, V.C., Sharif, S., Elting, S. et Abdullah, A. (2003). Application of response surface methodology in describing the performance of coated carbide tools when turning aisi 1045 steel. *Journal of Materials Processing Technology*, vol.145, p. 46-58.

Oliveira, V. (2010). Caracterização fitoquímica de folhas e frutos de *Arbutus unedo* L. Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar : *Escola Superior Agrária*. Bragança.

Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J.C., Castillo, M.D., Cano, M.P. et Pascual-Teresa, S. (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 21, p. 273-281.

Prasad, K.N., Kong, K.W., Ramanan, R.N., Azlan, A. et Ismail, A. (2012). Selection of experimental domain using two level factorial design to determine extract yield antioxidant capacity phenolics, and flavonoids from *Mangifera pajang* Kosterm. *Sep.Sci.Technol*, vol. 47(16), p. 2417–2423.

Prieto, P., Pineda, M. et Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, vol. 269, p. 337–341.

Radojkovic, M., Zekovic, Z., Jokic, S., Vidovic, S., Lepojevic, Z. et Milosevic, S. (2012). Optimization of solid–liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. *Food Technol. Biotechnol*, vol. 50(2).

Rechak, H., Rebiai, N. et Zabaïou, N. (2008). Contrôle de la qualité du beurre traditionnel Jijilien. Mémoire de fin d'étude et analyse. *Université de Jijel*. 1-90.

Ruiz-Rodríguez, B. M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Molina, M. et Tardío, J. (2011). Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, vol.44, p. 1244–1253.

Santiso, X., Lopez, L., Retuerto, R. et Barreiro, R. (2016). Population Structure of a Widespread Species under Balancing Selection: The Case of *Arbutus unedo* L. *Frontiers in Plant Science*, vol. 6, p. 1264.

Savic, M. I., Nikolic, V. D., Savic-Gajic, I. M., Nikolic, L. B., Ibric, S. R. et Gajic, D. G. (2015). Optimization of technological procedure for amygdalin isolation from plum seeds (*Pruni domesticae semen*). *Frontiers in plants science*, vol. 6, p. 1-11.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, C., Bryan, M. et Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Journal of food, Agriculture, Environement*, vol.1, p. 42-47.

- Silva, E.M., Rogez, H. et Larondelle, Y. (2007).** Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Sep.Purif. Technol*, vol. 55 (3), p. 381–387.
- Singleton, V. L. et Rossi, J. R. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic*, vol. 16 , p. 144–158.
- Takrouni, M.M., Ali, I.B.H., Messaoued, C. et Boussaid, M. (2012).** Genetic variability of Tunisian wild strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) populations interfered from isozyme markers. *Sci. Hort*, vol. 146, p. 92–98.
- Talantikite-Kellil, S. (2015).** Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie. Th.Doct. *Université M'hamedBougara*, p. 59.
- Telli, A., Mahboub, N., Boudjeneh, S., Siboukeur, O.E.K. et Moulti-Mati, F. (2010).** Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées, phoenixdactylifera l) variété GHARS. *Annales des Sciences et Technologie*, Vol. 2, N°2.
- Tonelli, N., Gallouin, F. (2013).** Des fruits et des graines comestibles du monde entier. Paris : *Lavoisier*, p. 87 -91.
- Turgis, F. (2013).** Amélioration de la fiabilité d'un système complexe Application ferroviaire : Accès voyageurs. Th. Doct. *Université de VALENCIENNES ET DU HAINAUT-CAMBRESIS*, p. 42, 59.
- Wahdame, B. (2006).** Analyse et optimisation du fonctionnement de piles à combustible par la méthode des plans d'expériences. Th. Doct. *UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE BELFORT MONTBELLARD ET UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE*, p. 25.
- Xiao, W., Han, L. et Shi, B. (2008).** Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoid from *Radix Astragali* using response surface methodology. *Sep. Sci.Technol*, vol. 43 (3), p. 671–681.
- Youn, K.K. et Choi, B.D. (2004).** A new response surface methodology for reliability based design optimization. *Computers and Structures. Computers & Structures*, vol. 82(2-3), p. 241-256.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. et Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, vol. 64 (4), p. 555–559.

Annexes

Annexe I : Courbes d'étalonnage

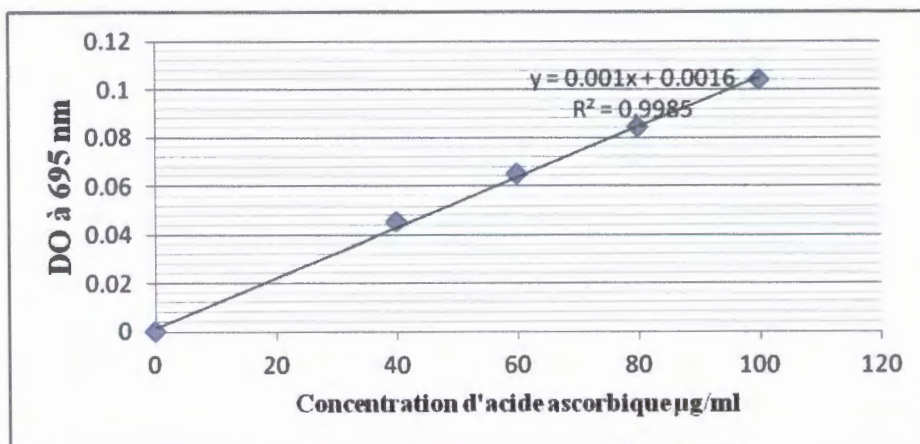


Figure 1 : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.

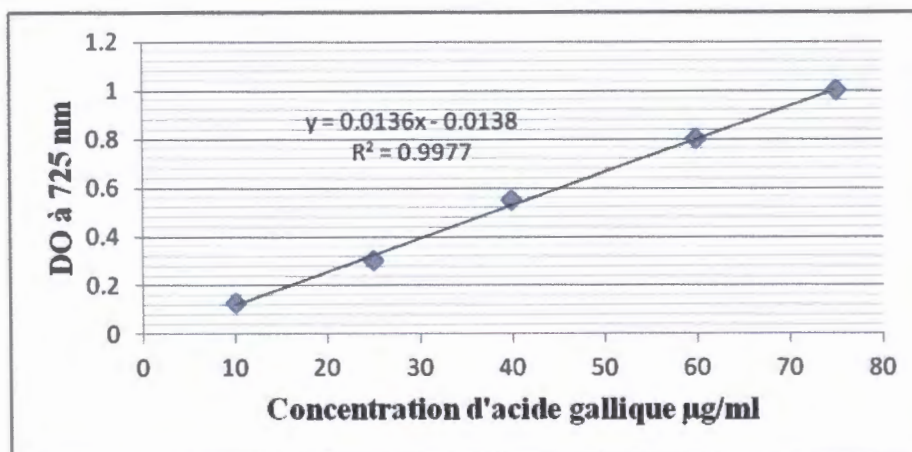


Figure 2 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

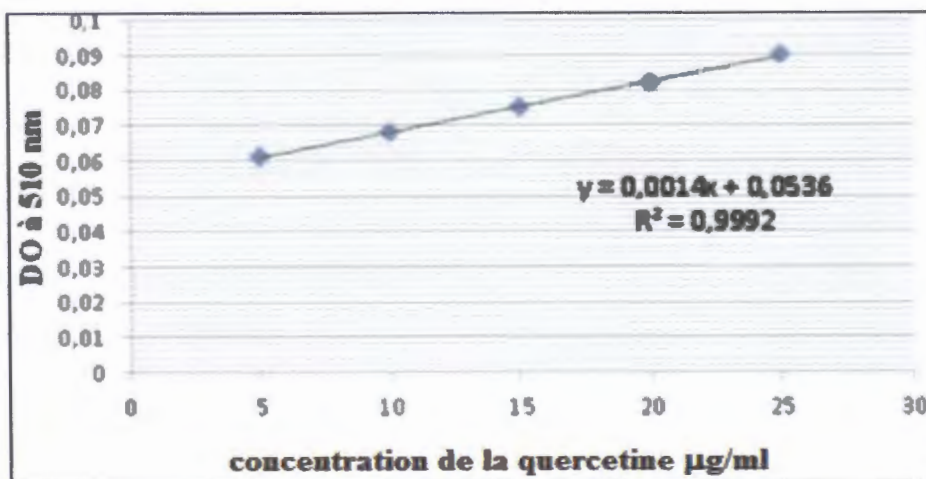


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

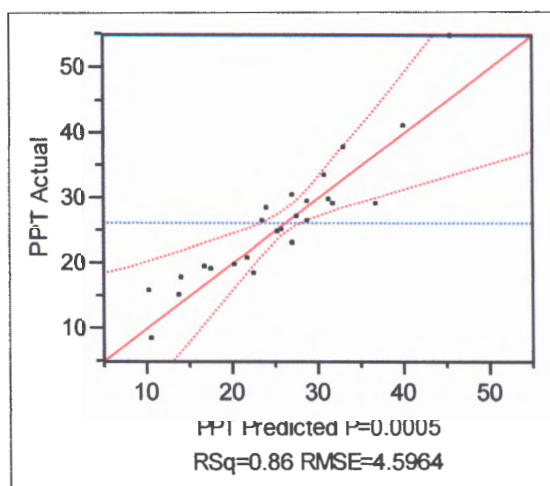
Annexe II : Optimisation d'extraction par le model CCD-précision uniforme

Figure 1 : Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux trouvées et celle prévues.

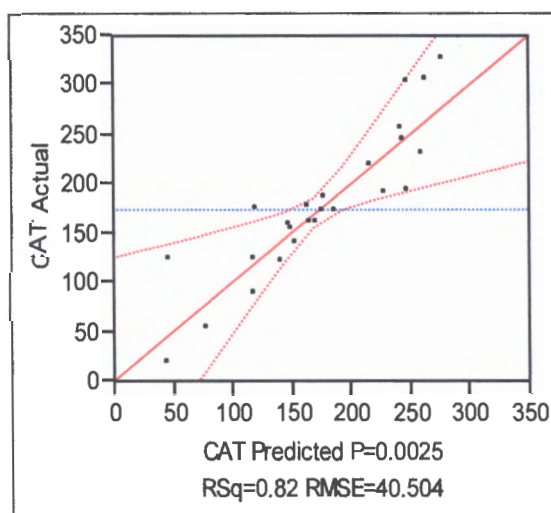


Figure 2 : Corrélation entre les activités antioxydantes totales trouvées et celle prévues.

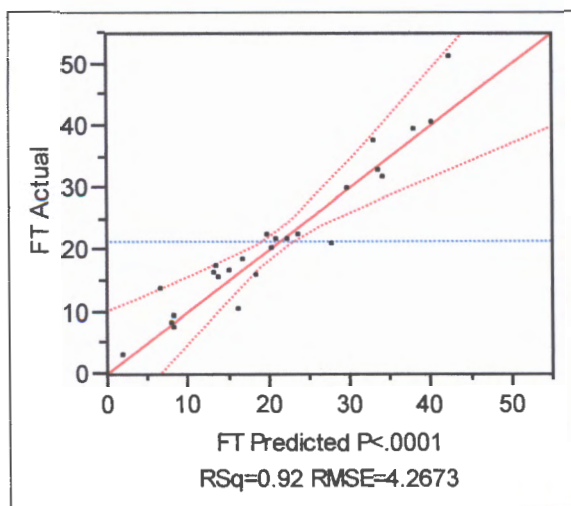


Figure 3 : Corrélation entre les teneurs en flavonoïde trouvées et celle prévues.

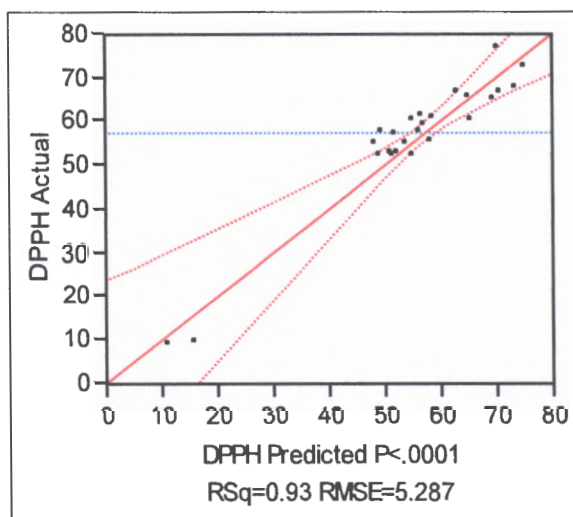


Figure 4 : Corrélation entre les valeurs trouvées de la réduction de DPPH et celle prévues.

Annexe III : Analyse par HPLC

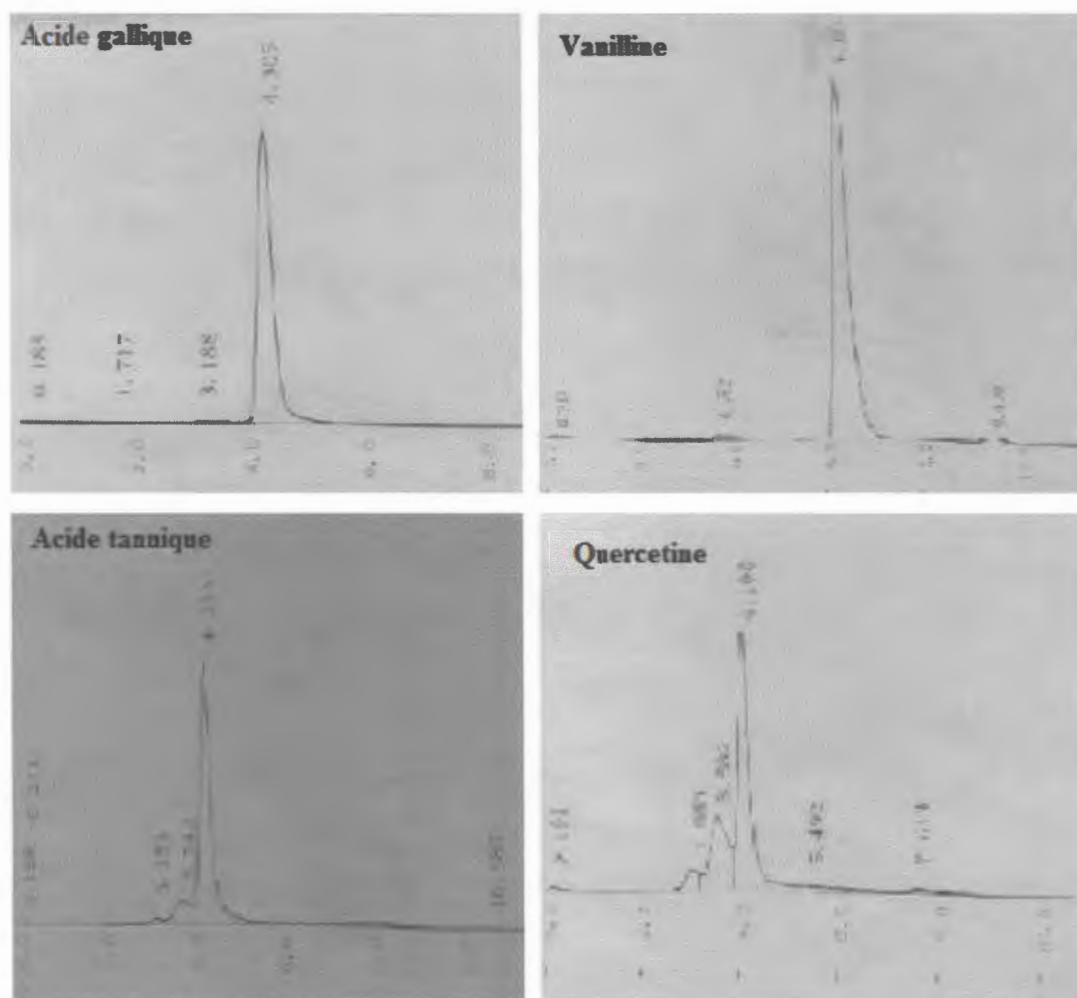


Figure 1: Chromatogrammes des antioxydants étalons.

Annexe IV : Analyse statistique des résultats**Tableau 01** : Les résultats d'acidité des échantillons du beurre pendant 15 jours de conservation frigorifique.

Conservation (jours)	A% Témoin	A% échantillon	S.S
Jour 0	0,780±0,098	1,690±0,197	
Jour 3	1,340±0,098	1,480±0,098	
Jour 6	1,200±0,098	1,620±0,098	
Jour 9	1,270±0,000	2,115±0,205	0,009**
Jour 12	1,340±0,098	1,690±0,197	
Jour 15	1,410±0,000	1,830±0,000	
Moyenne des échantillons	1,223±0,226	1,737±0,235	

S.S : Signification statistique

(*) Effet significatif ($P < 0.05$). (**) Effet hautement significatif ($P < 0.01$). (***) Effet très hautement significatif ($P < 0.001$).

Tableau 02 : Les résultats d'indice d'acide des échantillons du beurre pendant 15 jours de conservation frigorifique.

Conservation (jours)	Ia Témoin	Ia Echantillon	S.S
Jour 0	3,295±2,283	4,625±0,799	
Jour 3	14,725±2,382	17,530±0,791	
Jour 6	18,790±0,989	16,615±5,055	

Jour 9	16,060±0,098	17,250±0,593	
Jour 12	11,780±4,157	14,660±0,494	0,004**
Jour 15	19,280±0,098	20,615±0,388	
Moyenne des échantillons	13,988±5,873	15,215±5,508	

S.S : Signification statistique

(*) Effet significatif (P<0.05). (**) Effet hautement significatif (P<0.01). (***) Effet très hautement significatif (P<0.001).

Tableau 03 : Les résultats de l'indice de peroxyde des échantillons du beurre pendant 15 jours de conservation frigorifique.

Conservation (jours)	Ip Témoin	Ip Echantillon	SS
Jour 0	0,175± 0,106	0,125±0,035	
Jour 3	0,3000±0,070	0,250±0,070	
Jour 6	0,350±0,070	0,200±0,141	0,005**
Jour 9	0,325±0,035	0,250±0,212	
Jour 12	0,400±0,070	0,275±0,176	
Jour 15	0,425±0,035	0,250±0,141	
Moyenne des échantillons	0,304±0,231	0,350±0,237	

S.S : Signification statistique

(*) Effet significatif (P<0.05). (**) Effet hautement significatif (P<0.01). (***) Effet très hautement significatif (P<0.001).

Tableau 04 : Les résultats de l'indice de saponification des échantillons du beurre pendant 15 jours de conservation frigorifique.

Conservation (jours)	Is Témoin	Is Echantillon	SS
Jour 0	220,895±4,956	227,905±10,910	
Jour 3	224,405± 3,966	232,820±7,933	
Jour 6	206,870± 2,969	213,880± 0,989	
Jour 9	222,295± 2,976	225,100± 6,943	0,475
Jour 12	206,170± 1,979	207,570± 5,953	
Jour 15	216,940± 7,297	204,765± 3,966	
Moyenne des échantillons	217,430± 9,77382	217,505 ±11,052	

S.S : Signification statistique

(*) Effet significatif ($P < 0.05$). (**) Effet hautement significatif ($P < 0.01$). (***) Effet très hautement significatif ($P < 0.001$).

Tableau 05 : Les résultats du pH des échantillons du beurre pendant 15 jours de conservation frigorifique.

Conservation (jours)	pH Témoin	pH Echantillon	S.S
Jour0	6,690±0,014	5,300±0,311	
Jour 3	5,900±0,070	5,180±0,000	
Jour 6	5,345±0,700	4,585±0,162	
Jour 9	4,835±0,035	4,860±0,084	0,048*

Résumé

Plusieurs études indiquent le rôle important joué par les fruits sauvages « peu connus » car ils contiennent des composés nutritionnels et fonctionnels avec des propriétés biologiques. L'objectif de cette étude était d'optimiser les conditions d'extraction pour les paramètres de l'activité antioxydante totale, des polyphénols totaux, des flavonoïdes et de radical libre DPPH des fruits d'arbousier matures (*Arbutus unedo* L.) en utilisant la méthodologie de surface de réponse (RSM) et d'étudier le pouvoir conservateur de l'extrait optimale (TAC) sur le beurre traditionnel en analysant les caractéristiques physicochimiques de ce produit.

La conservation du beurre par l'extrait optimal d'*Arbutus unedo* L. a été suivie par une période de quinze jours. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une légère diminution du pH et d'indice de saponification accompagnée d'une légère augmentation de l'acidité, d'indice d'acide et d'indice de peroxyde.

Mots clés : *Arbutus unedo* L., optimisation, composés bioactifs, beurre, bio-conservation, caractéristiques physicochimiques.

Abstract

Several studies indicate the important role played by wild fruits "little known" because they contain nutritional and functional compounds with biological properties. The objective of this study was to optimize the extraction conditions for the parameters of the total antioxidant activity of total polyphenols, flavonoids and free radical DPPH of mature arbutus fruits (*Arbutus unedo* L.) using the response surface methodology (RSM) and study the conservative power of the optimal extract (TAC) on traditional butter analyzing the physicochemical characteristics of the product.

The conservation of butter by the optimal extract of *Arbutus unedo* L. was followed by a period of fifteen days. The results obtained show that there is a slight decrease in the pH and saponification value accompanied by a slight increase in acidity, acid value and peroxide value.

Keywords: *Arbutus unedo* L., optimization, bioactive compounds, butter, bio-conservation, physicochemical characteristics.

الملخص

تشير العديد من الدراسات الى أهمية الدور الذي تلعبه الثمار البرية "غير معروفة" لأنها تحتوي على مرغبات غذائية ووظيفية مع خصائص بيولوجية. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد الشروط المثالية لاستخراج مؤشرات النشاط المضاد للأكسدة، البوليفينولات الكلية، الفلافونويدات والجنور الحرة من ثمار القطلب البري الناضجة باستعمال منهجية اجابة السطح و دراسة قدرة المستخلص الأمثل في حفظ الزبدة التقليدية و هذا بتحليل الخصائص الفيزيوكيميائية للمنتج. حفظ الزبدة بواسطة المستخلص المثالي لفاكهة القطلب البري تبعته فترة قدرها خمسة عشر يوما. تظهر النتائج انخفاضا طفيفا في الرقم الهيدروجيني ورقم التصبن مرفوقة بارتفاع طفيف في الحموضة، القيمة الحمضية وقيمة البيروكسيد.

الكلمات المفتوحة: القطلب البري، تحسين، المركبات الفعالة حيويًا، الزبدة، الحفظ الحيوي، الخصائص الفيزيوكيميائية.

