

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de
l'Univers

Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physicochimie, synthèse et activité
biologique

Département de Biologie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

Master

En Sciences Biologiques

Option : Biochimie

Thème

Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des
extraits aqueux et hydrométhanolique des graines de
Coffea arabica

Soutenu le : 30/06/2019

Préparé par : NAS Asma

Président :	AZZI R.	MCA	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Examineur :	CHAUCHE M. T.	MCB	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Rapporteur :	RAHMOUN M.N.	MCA	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Invité :	AISSAOUI M.	Doctorant	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Année universitaire : 2018 – 2019

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique **LapSaB**. Université Abou Bakr Belkaid- Tlemcen.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à mon encadreur **Mr. RAHMOUN M. N.** Maître de conférences classe A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, pour sa disponibilité, ses conseils judicieux, mais surtout pour sa qualité humaine. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement **Mr. AZZI Rachid**, Maître de conférences classe A à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen. C'est un grand honneur pour moi de vous avoir comme président du jury.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à **Mr. CHAOUCHE Mohammed Tarik**, Maître de conférences B, à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen pour avoir accepté d'être membre de ce jury et examiner ce modeste travail.

Un merci tout particulier à **Mr. AISSAOUI M.**, **Mr. BAREK S.** et **Mr. TERKI M.** doctorants au laboratoire **LapSaB** à l'université Abou bekr Belkaïd de Tlemcen, pour leurs aide et soutien, leurs précieux conseils, leur gentillesse, et l'enthousiasme qu'ils ont manifesté au cours des manipulations.

Je souhaite également remercier chaleureusement tous mes enseignants durant mon cursus universitaire pour leurs encouragements et leurs conseils.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail.

Dédicaces

A l'aide du tout puissant '**Allah**', le Miséricordieux, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A ceux que personne ne peut compenser les sacrifices pour mon éducation et mon bien être, ceux qui m'ont accordé leur soutien, amour et bénédiction dans les instants les plus difficiles de mon existence,

mes parents,

qui me sont les plus chers au monde. Qu'Allah me les garde. Vos prières et vos conseils ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études. Je voudrais à travers ce modeste travail, vous rendre un hommage mérité et vous dire combien je suis fière de l'éducation que vous m'avez donnée. Puisse le Tout Puissant nous accorder de vous avoir encore longtemps auprès de nous pour que vous puissiez bénéficier de l'ombre de l'arbre que vous avez si jalousement protégé et entretenu.

A tous **mes frères** et à toutes mes belles sœurs, qui m'ont encouragé et m'ont donnée la force d'aller jusqu'au bout. Qu'Allah vous protège.

A mes sœurs **Fatima** et **Noria** et leurs petites familles que Dieu les protège et les prête la bonne santé et une longue vie.

A mon petit frère **Yasser** mon chéri que j'adore plus fort que moi même, que Dieu te protège.

A toutes mes chères nièces et mes neveux en témoignage de mon amour et ma profonde admiration.

En témoignage de tout mon amour, je dédie ce travail à toutes mes copines **Aicha, Dounia Kawther, Soumia, Farah, Latifa, et Faiza** qui m'ont toujours encouragé, poussé et motivé dans mes études. Continuons dans la voie de la consolidation de nos liens de fraternité et d'amitié.

A tous les membres du laboratoire **LABSAP** et mes collègues de la promotion **2018-2019**.

A tous ceux qui me sont chers



Table de matières

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des Abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction..... 01

Première partie : Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le caféier 05

II. Taxonomie du caféier..... 05

III. Utilisation du café en médecine traditionnelle..... 06

IV. L'espèce d'étude : *Coffea arabica*..... 07

V. Description botanique de *Coffea arabica*..... 07

VI. Composition des graines de *Coffea arabica* et intérêt thérapeutique..... 08

VI. 1. Les alcaloïdes..... 10

VI. 1. 1. La caféine..... 10

VI. 1. 2. La trigonelline..... 11

VI. 1. 3. La théobromine et la théophylline..... 12

VI. 2. Les polyphénols..... 13

VI. 3. Les diterpènes : Cafestol et kahweol..... 14

Deuxième partie : Matériel et méthode

I. Matériel..... 17

I.1. Matériel végétal..... 17

I.2. Matériel biologique..... 17

II. Méthodes..... 18

II.1. Préparation des extraits..... 18

II.2. Rendement de l'extraction..... 19

II.3. Estimation des teneurs en métabolites secondaires..... 19

II.3.1. Dosage des phénols totaux..... 19

II.3.1.1. Principe..... 19

II.3.1.2. Mode opératoire..... 19

II.3.2. Dosage des flavonoïdes..... 20

II.3.2.1. Principe..... 20

II.3.2.2. Mode opératoire..... 20

II.3.3. Dosage des tanins condensés 20

II.3.3.1. Principe..... 20

II.3.3.2. Mode opératoire..... 20

II.4. Mise en évidence de l'activité antioxydante..... 21

II.4.1. Recherche de l'activité anti-radicalaire..... 21

II.4.1.1. Principe..... 21

II.4.1.2. Mode opératoire..... 21

II.4.1.3. Calcul des CI_{50} 21

II.4.2. Recherche du pouvoir réducteur du fer (FRAP)	21
II.4.2.1. Principe.....	21
II.4.2.2. Mode opératoire.....	22
II.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	22
II.5.1. L'évaluation de l'activité antibactérienne	22
II.5.1.1. La méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé.....	22
II.5.1.2. La concentration minimale inhibitrice.....	23
II.5.2. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	23
 Troisième partie : Résultats et interprétations	
I. Rendement des extraits.....	25
II. Teneurs en composés phénoliques.....	26
II.1. Polyphénols totaux.....	26
II.2. Les flavonoïdes.....	27
II.3. Les tanins condensés	29
III. Evaluation de l'activité antioxydante.....	30
III.1. Technique de piégeage du radical libre DPPH.....	30
III.2. Le pouvoir réducteur du Fer (FRAP)	32
IV. Activités antimicrobiennes.....	34
IV.1. Activité antibactérienne.....	34
IV.2. Activité antifongique.....	36
 Discussion générale.....	 38
 Quatrième partie	
Conclusion générale.....	44
Références bibliographiques.....	45
Annexe.....	55

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الأنشطة البيولوجية للبذور الخضراء في نبات *Coffea arabica*. تم استخلاص 8 مستخلصات: المائية والميثانولية الخامة، مستخلصا الأسيئات ايثيل، مستخلصا ال n-بوتانول والمستخلصان المتبقيان. استخدمت المستخلصات في تحديد محتويات البوليفينول الكلي والفلافونويد والتانا المكثفة بواسطة طرق الفولين سيوكالتو، ثلاثي كلوريد الالمنيوم والفانيلين على التوالي. أجريت دراسة النشاط التأكسدي بواسطة تقنية تثبيط الجذر الحر DPPH وطريقة إرجاع الحديد FRAP. كما ان النشاط المضاد للميكروبات أنجز بطريقتين: طريقة الإنتشار في وسط صلب وطريقة التركيزات المثبطة CMI في وسط سائل، ضد بكتيريا (à Gram positif و à Gram négatif) وخمائر. أظهرت النتائج أن مستخلصا ال n-بوتانول هما الأكثر ثراءً من حيث البوليفينول الكلي، اما الفلافونويدات وجدت بمحتوى عالي في مستخلصات ال n-بوتانول و الأسيئات ايثيل الميثانولية الخامة. محتويات التانا المكثفة هامة في والمستخلصان الميثانولي الخام والمائي الخام على التوالي. قدرة تثبيط الجذر الحر DPPH لجميع المستخلصات المائية معتبرة أكثر مقارنة مع المحصل عليها من طرف المستخلصات الهيدروميثانولية حيث ان قيم IC_{50} للمستخلصات المائية قريبة من تلك المسجلة من طرف حمض الأسكوربيك. سجلت مستخلصات ال n-بوتانول قيم EC_{50} لإرجاع الحديد أكثر اهمية مقارنة مع المستخلصات الأخرى، ولكن تظل هذه القدرة لإرجاع الحديد ضعيفة مقارنة مع قدرة BHA وحمض الأسكوربيك. أوضحت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا أن المستخلص المائي الخام اعطى التركيز المثبط المنخفض والأكثر إثارة للاهتمام، فيما يتعلق ببكتريا *Staphylococcus aureus* ATCC 6538، حيث قدر ب 0.156 ملغ/مل. كما اظهر ايضا هذا المستخلص النشاط المضاد للفطريات الاكثر اهمية على وسط صلب، حيث قام بتثبيط الخمائر الثلاث المستخدمة باقطار مناطق تثبيط محصورة ما بين 10 و 13.5 ملم.

الكلمات المفتاحية: *Coffea arabica*، البذور الخضراء، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للفطريات.

Résumé

Cette étude vise à évaluer les activités biologiques des graines vertes de la plante *Coffea arabica*. 2 extraits bruts (l'eau et l'hydrométhanol) et 6 fractions (l'acétate d'éthyle, le n-butanol et phase résiduelle) ont été utilisés dans cette étude. Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins condensés ont été déterminées par les méthodes de Folin-Ciocalteu, de trichlorure d'aluminium et de vanilline, respectivement. L'étude de l'activité antioxydante a été réalisée par la technique de piégeage du radical libre (DPPH) et la méthode de réduction du Fer (FRAP). Le potentiel antimicrobien a été mis en évidence vis-à-vis des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et des levures par la technique de diffusion des disques sur gélose et par la technique des microdilutions sur des microplaques.

Les résultats du dosage montrent que les fractions n-butanoliques sont les plus riches en polyphénols totaux. Les fractions n-butanolique et d'acétate d'éthyle de l'extrait hydrométhanolique renferment les teneurs les plus élevés en flavonoïdes. Les teneurs les plus élevés en tanins condensés sont enregistrés par l'extrait brut hydrométhanolique suivi par l'extrait brut aqueux. L'extrait aqueux et ses fractions ont montré des CI_{50} proches de celles obtenues par l'acide ascorbique et inférieures à celles données par les extraits hydrométhanoliques. Les fractions n-butanoliques ont donné les CE_{50} réductrices du fer les plus intéressantes par rapport aux autres extraits.

L'étude de l'activité antibactérienne a montré que l'extrait aqueux brut présente la CMI la plus intéressante, elle est de 0,156 mg/mL vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Cet extrait a montré également l'activité antifongique la plus importante sur milieu gélosé (10 et 13.5 mm). CMI vis-à-vis les levures étaient élevées.

Mots clés : *Coffea arabica*, Graines vertes, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract

This study focusses to evaluate the biological activities of the green seeds of the *Coffea arabica* plant. 2 crude extracts (aqueous and hydromethanol) and 6 fractions (ethyl acetate, n-butanol and residual phase) were used in this study.

The contents of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins were determined by the methods of Folin-Ciocalteu, aluminum trichloride and vanillin, respectively. The study of the antioxidant activity was carried out by free radical scavenging technic (DPPH) and Ferric reducing power method (FRAP). The antimicrobial potential was established against Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeast, by the agar disk diffusion and the micro-dilution methods.

Obtained results showed that the n-butanol fractions are the richest in total polyphenols. The n-butanol and ethyl acetate fractions of the hydromethanol extract contain the highest levels of flavonoids. The highest contents of condensed tannins are recorded by the hydromethanolic crude extract followed by the aqueous crude extract. The aqueous extract and its fractions showed IC₅₀ values close to those obtained by ascorbic acid and lower than those given by hydromethanolic extracts. The n-butanol fractions gave the most interesting iron reducing EC₅₀ compared to the other extracts.

The study of the antibacterial activity showed that the crude aqueous extract has the most interesting MIC = 0.156 mg / mL with respect to *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. This extract exerts also the most important antifungal activity on agar medium (10 and 13.5 mm). MICs against yeasts were high.

Key words: *Coffea arabica*, green seeds, polyphenols compounds, antioxidant activity, antibacterial activity, antifungal activity.

Liste des abréviations

ATCC	: American Type Culture Collection
BHA	: Butylated hydroxyanisol
CE₅₀	: Concentration efficace médiane
CI₅₀	: Concentration inhibitrice à 50%
CLSI	: Clinical and Laboratory Standard Institute
CMI	: Concentration Minimal Inhibitrice
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
FAO	: Food and drug Organisation
FRAP	: Ferric reducing antioxidant power
Gent	: Gentamicine
IP	: Institut Pasteur
UFC	: Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 01	: Les cerises de <i>Coffea arabica</i>	08
Figure 02	: Coupe du fruit du café.....	08
Figure 03	: Structure chimique de la caféine.....	11
Figure 04	: Structure chimique de la trigonelline (A) et l'acide nicotinique (B).....	12
Figure 05	: Structure de la Théophylline (A) et la théobromine (B).....	12
Figure 06	: Acides chlorogéniques et composés apparentés.....	14
Figure 07	: Structure chimique des diterpènes : Cafestol (A) ; kahweol(B).....	15
Figure 08	: Rendements des différents extraits des graines vertes de <i>Coffea arabica</i>	25
Figure 09	: Courbes d'étalonnage de l'acide gallique pour les polyphénols.....	27
Figure 10	: Représentation des teneurs en polyphénols totaux.....	27
Figure 11	: Courbes d'étalonnage de la catéchine pour les flavonoïdes.....	28
Figure 12	: Représentation des teneurs en flavonoïdes.....	28
Figure 13	: Courbes d'étalonnage de la catéchine pour les tannins condensés.....	29
Figure 14	: Représentation des teneurs en tannins condensés.....	30
Figure 15	: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des extraits aqueux des graines vertes de <i>Coffea arabica</i>	31
Figure 16	: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des extraits hydrométhanoliques des graines vertes de <i>Coffea arabica</i>	31
Figure 17	: Evolution des absorbances en fonction des concentrations des extraits aqueux des graines vertes de <i>Coffea arabica</i>	33
Figure 18	: Evolution des absorbances en fonction des concentrations des extraits hydrométhanoliques des graines vertes de <i>Coffea arabica</i>	33

Liste des tableaux

Tableau 1	: Composition des graines de <i>Coffea arabica</i>	09
Tableau 2	: Souches utilisées dans les tests antimicrobiens.....	18
Tableau 3	: Caractéristiques des différents extraits des graines vertes de <i>Coffea arabica</i>	26
Tableau 4	: CI ₅₀ des extraits aqueux et hydrométhanoliques des graines vertes de <i>Coffea arabica</i> ainsi que des standards.....	32
Tableau 5	: CE ₅₀ des extraits aqueux et hydrométhanoliques des graines vertes de <i>Coffea arabica</i> ainsi que les standards.....	34
Tableau 6	: Diamètres des zones d'inhibition en mm des extraits des graines vertes de <i>Coffea arabica</i>	35
Tableau 7	: Concentrations minimales inhibitrice de l'activité antibactérienne des extraits des graines vertes de <i>Coffea arabica</i>	36
Tableau 8	: Diamètres des zones d'inhibition en mm de l'activité antifongique des extraits des graines vertes du <i>Coffea arabica</i>	37
Tableau 9	: Concentration minimales inhibitrice de l'activité antifongique des extraits des graines vertes du <i>Coffea arabica</i>	37

Introduction

Depuis l'antiquité, les plantes attirent l'attention de l'être humain par leurs propriétés nutritives et médicinales (**Din et al., 2011**). Elles ont été utilisées de façon empirique comme des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ayant les capacités à soulager les douleurs, guérir les maux et panser les blessures (**Tabuti et al., 2003 ; Abdelhalim et al., 2017**). Leurs utilisations à des fins thérapeutiques ont été rapportées dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindou, grecque et romaine (**Khan, 2014 ; Yuan et al., 2016**).

En 2008, l'organisation mondiale de la santé a estimé que 75% de la population mondiale et plus de 80% de la population africaine ont eu recours aux plantes médicinales comme soins primaires avec des efficacités vis-à-vis de plusieurs pathologies et un faible taux de toxicité par rapport aux médicaments pharmaceutiques (**Dibong et al., 2011; Pan et al., 2014**).

En outre de l'usage traditionnel, la médecine moderne s'intéresse aux plantes de jour en jour. On estime qu'environ 25% de tous les médicaments "modernes" sont dérivés de plantes médicinales (**Sahoo et al., 2010**).

Cet intérêt croissant aux plantes médicinales est basé sur la question de la sécurité et des limites thérapeutiques des médicaments chimiques utilisés en médecine. Entre autres, les antioxydants de synthèse sont avérés être responsables de plusieurs effets indésirables et également l'usage excessif des agents antimicrobiens chimiques dans la médication humaine qui a conduit à l'apparition de souches multi-résistantes (**Mau et al., 2004**).

Donc, l'engagement de la recherche dans la découverte de nouveaux médicaments à partir des plantes médicinales constitue une étape indispensable pour l'essor de tout un secteur lié aux besoins non seulement de la thérapie, mais aussi de l'industrie agroalimentaire, de la cosmétique et de la parfumerie.

Parmi les plantes les plus consommées dans le monde entier, nous citerons le café. Sa consommation est bénéfique pour la santé en raison de sa composition chimique qui comprend des composés phénoliques, alcaloïdes, vitamines, composés volatils et minéraux (**Ballesteros et al., 2015; Dong et al., 2015**). De plus, ses principes actifs possèdent également des propriétés antioxydantes qui réduisent l'incidence du cancer, du diabète et des maladies du foie (**Bhupathiraju et al., 2012 ; Cano-Marquina et al., 2013 ; Babova et al., 2016**), des propriétés antibactériennes et antifongiques (**Wijaya et al., 2016 ; Rakatama et al., 2018**).

Cette plante contient plusieurs espèces dont les plus connues sont : *Coffea arabica* L. (arabica) et *Coffea canephora* dit café robusta (**Patay et al., 2016c**). Ces deux espèces représentent 75 % et 24 % de la production mondiale respectivement (**Jeszka-Skowron et al., 2015**).

Le présent travail s'intéresse à étudier le potentiel biologique des graines vertes de *Coffea arabica* en effectuant :

- Une évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ainsi que par la méthode du pouvoir réducteur du fer (FRAP).
- Un criblage des activités antibactériennes et antifongiques des différents extraits.

Première partie

Synthèse
bibliographique

I. Généralités sur le caféier

Le café est l'une des boissons les plus consommées dans le monde. Environ 7 millions de tonnes sont consommées par an selon l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (**Baeza et al., 2014**).

Le mot « Cahouah » est né en Afrique dans la région d'Ethiopie (Kaffa). A partir de cette région la plante s'est propagée au Yemen, Arabie saoudite et en Egypte, où sa consommation s'est développée considérablement et a franchit la vie quotidienne des populations. Il s'est transformé en « Kahve » en turc puis en « caffè » en italien. Au début du 16^{ème} siècle, les premiers commerçants vendirent le café en Europe. Au cours des années 1800, le café a été cultivé pour la première fois à Rio de Janeiro et s'est développé, jusqu'à ce qu'il devienne la plus importante ressource économique du Brésil. La culture du café était intensivement introduite aux Etats-Unis vers 1920 et à ce moment-là que qualité générale de la boisson de café s'est considérablement améliorée (**Grandjean et Tulet, 2000**).

II. Taxonomie et classification du caféier

Du point de vue taxonomique, le caféier appartient à la famille des *Rubiacées* qui comporte 450 genres et plus de 6500 espèces (**Patay et al., 2016b et c**). Le genre le plus connu est celui de *Coffea*, très bien connu par ces propriétés pharmacologiques (**Patay et al., 2016a**).

Plus de 120 espèces du genre *Coffea* et leurs variétés sont mentionnées dans les rapports scientifiques (**Davis et al., 2011 ; Patay et al., 2016c**) dont les plus connues sont *Coffea arabica* L., *Coffea robusta* L. et *Coffea liberica* Hiern. Ces espèces ont une valeur commerciale significative et occupent la deuxième position après le pétrole dans le marché international (**Patay et al., 2014 ; Patay et al., 2016a et c**).

La classification botanique du café est comme suit (**Thorn, 2002**) :

Domaine : *Eukaryota*

Règne : *Plantae*

Division : *Angiospermae*.

Classe : *Dicotyledoneae*.

Sous –classe : *Sympetalae ou Metachlamydeae*

Ordre : *Rubiales*

Famille : *Rubiaceae*

Genre : *Coffea*

III. Utilisation du café en médecine traditionnelle

Plusieurs travaux scientifiques ont rapporté l'usage traditionnelle en médecine humaine et vétérinaire du café allant des différentes parties de la plante jusqu'aux graines (**Patay et al., 2016a**). La boisson préparée à partir de graines de *Coffea arabica* était utilisée pour traiter la grippe au Brésil, alors qu'à Cuba, l'extrait obtenue par l'eau chaude des graines était connu sous le nom de médicament aphrodisiaque. Au Nicaragua, la décoction des graines était utilisée par voie orale pour lutter contre la fièvre et comme médicament astringent. Au Pérou, l'extrait aqueux de graines séchées était utilisé pour la fatigue, en Thaïlande comme médicament cardiotonique et neurotonique et en Inde occidentale comme un traitement contre l'asthme (**Patay et al., 2016a**).

En Afrique, les graines du café d'origine arabe étaient utilisées contre les crises d'asthme et la sève des feuilles sont consommées pour traiter la diarrhée et les douleurs intestinales (**Lamorde et al., 2010**).

En Éthiopie, les habitants consommaient une boisson à base de lait, du miel et du péricarpe des cerises du café pour traiter les intoxications accompagnées de diarrhée et de nausée. (**Belayneh et Bussa, 2014**).

Les feuilles fraîches du café sont utilisées pour traiter la migraine par application direct sur les parties douloureuses ou en les buvant en infusion. Elles sont également utilisées dans le traitement des maux de tête et d'estomac par décoction et comme un antitussif en infusion.

Elles sont aussi efficaces contre la fièvre et dans la stimulation de la production de prolactine (Ross, 2005).

Le charbon de café est utilisé pour traiter les plaies purulentes, la pharyngite et la stomatite (Patay *et al.*, 2016a).

IV. L'espèce d'étude : *Coffea arabica*

L'espèce *Coffea arabica* est une plante ligneuse vivace dicotylédone, elle se développe le plus souvent à des altitudes comprises entre 1250 et 2500 mètres et à une température entre 17°C et 29°C (Ross, 2005). Sa culture exige une précipitation allant de 1500 à 2500 mm/an pour le développement optimal de la plante et du fruit (Davis *et al.*, 2012). Elle est originaire d'Afrique, plus précisément des hauts plateaux du Sud-Ouest de l'Ethiopie (Labouisse et Adolphe, 2012). Les grands champs de culture de cette espèce se situent principalement en Amérique latine avec 82 % de la production mondiale contre 19 % en Afrique et en Asie (Bertrand *et al.*, 2012).

V. Description botanique de *Coffea arabica*

Coffea arabica est un arbuste ramifié, de 10 mètres de hauteur. Elle possède des feuilles persistantes, positionnées sur les branches de manière opposée. Les fleurs sont de couleur blanches, odorantes, rassemblées en glomérules à l'aisselle des feuilles. Les premières fleurs apparaissent dès la 3^{ème} à 4^{ème} année (Davis *et al.*, 2012).

Le fruit du caféier, appelé cerise, est une drupe de forme ovoïdale (Figure 01) qui change de couleur du vert au rouge une fois mûr. La drupe est entourée d'une pellicule rouge lisse, l'exocarpe. Ce dernier recouvre la pulpe (mésocarpe) qui se différencie en un tissu très vacuolisé riche en sucres et en acides qui ont un rôle attractif pour les animaux pollinisateurs. La pulpe adhère à une paroi dure et cellulosique, la parche (ou l'endocarpe), elle renferme les deux fèves à partir desquelles les graines de café sont produites. La graine, recouverte d'une pellicule argentée et très mince "le tégument séminal", renferme l'embryon (Figure 02) (Del Castillo *et al.*, 2002).



Figure 01 : Les cerises de *Coffea arabica* (Duangjai *et al.*, 2016)

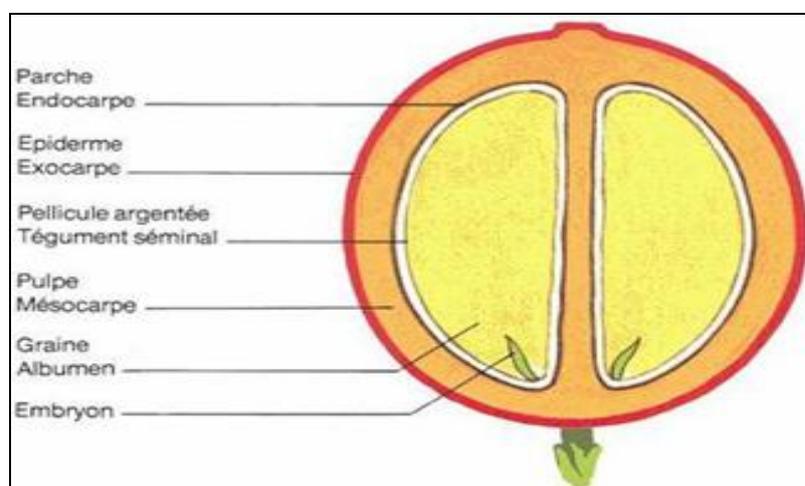


Figure 02 : Coupe du fruit du café (Del Castillo *et al.*, 2002)

VI. Composition des graines de *Coffea arabica* et intérêt thérapeutique

Les graines de l'espèce *Coffea arabica* possèdent une grande variété de substances bénéfiques pour la santé, dont les groupes les plus représentatifs sont les alcaloïdes (caféine, trigonelline, théobromine, théophylline...etc), les polyphénols (acide chlorogénique, acide caféique), les huiles grasses, les caroténoïdes, les enzymes, les phytostérols (sitostérol, dihydro-sitostérol, stigmastérol ...etc), les tanins, les glucides (monosaccharides, oligosaccharides et polymères), les acides aliphatiques volatiles et les acides non volatiles (acides citrique, oxalique, acétique, isovalérique, décanoïque...etc) et les minéraux (K, P, Na, Mg) (Farah, 2012). Elles contiennent également des diterpénoïdes (cafestol et kahweol) (Tableau 1) (Affonso *et al.*, 2016).

Cette composition peut varier qualitativement et quantitativement selon les conditions géographiques de culture (Ribeiro *et al.*, 2016).

Tableau 1 : Composition des graines de *Coffea arabica* (Belitz *et al.*, 2009 ; Farah, 2012).

Composés	Concentration en g/100g de matière sèche	Constituants
Monosaccharides	0,2-0.5	Fructose, glucose, galactose, arabinose (traces)
Oligosaccharides	6-9	Sucrose (>90%), raffinose (0-0,9%), stachyose (0-0,13%)
Polysaccharides	3-4	Polymère de galactose (55-65%), mannose (10-20%), arabinose (20-35%), glucose (0-2%)
Polysaccharides insolubles	46-53	/
Hémicelluloses	5-10	galactose (65-75%), arabinose (25-30%), mannose (0-10%)
Cellulose B (1,4) mannane	41-43	/
Acides volatiles	0,1	/
Acides aliphatiques non volatiles	2-2,9	Acide citrique, acide malique, acide quinique
Tanins	6,7-9,2	Acide chlorogénique Mono-, dicaffoyl-, et acide feruloylquinique
Lignine	1-3	/
Lipides	15-18	/
La cire (Wax)	0,2-0,3	/
Huiles	7,7-17,7	Acides Gras 16 :0 et 18 :2 ^{9,12}
Composés azotés	11-15	/
Acides aminés libres		Glu, Asp, Asp -NH ₂
Protéines	8,5-12	/
Alcaloïdes	0,8-1,4	Caféines, Traces de théobromine et théophylline,
	0,6-1,2	Trigonelline
Minéraux	3-5,4	K, P, Na, Mg
Vitamines	0.02 – 0.11	Riboflavine (Vitamine B2), acide nicotinique (niacin ou Vitamine B3), acide pantothenique (vitamin B5)

VI. 1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés, basiques. Ce sont des composés hétérocycliques doués de propriétés biologiques importantes même à faible dose. Ils interviennent dans les mécanismes de défense des plantes contre les herbivores (**Yinyang et al., 2014**).

De nombreux travaux ont montré que les alcaloïdes sont doués d'un grand intérêt pharmacologique : activité antiplasmodiale, antispasmodique et anticancéreuse. Leurs effets laxatif et antirhumatismal, antalgique et analgésique ont aussi été révélés (**N'Guessan et al., 2009 ; Bla et al., 2015**).

Les alcaloïdes dérivent des acides aminés, ils sont divisés en trois classes : les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes et les proto-alcaloïdes (**Yinyang et al., 2014**).

VI. 1. 1. La caféine

La caféine (**Figure 03**) constitue l'alcaloïde majoritaire des espèces du café (**Patay et al., 2016a**). Sa formule brute est $C_8H_{10}N_4O_2$ et sa masse moléculaire est de 194,19 g/mol (**Haler, 2013**). C'est une méthylxanthine (1,3,7-*N*-triméthylxanthine) thermostable responsable de l'amertume du café (**Farah, 2012**).

Cet alcaloïde est un antagoniste des récepteurs de l'adénosine et donc stimule le système nerveux central (**Marx et al., 2016**). Sa consommation de façon modérée réduit la fatigue, augmente la disponibilité en énergie, la vigilance et la concentration, et améliore les performances physiques. Il réduit également le stress oxydatif et protège le système antioxydant dans les cellules épithéliales pulmonaires induites par l'hypoxie. Il est considéré également comme un inhibiteur des produits de peroxydation lipidique induite par le peroxyde d'hydrogène dans les fibroblastes de la peau humaine (**Jeszka-Skowron et al., 2016**).

Les métabolites de la caféine du café ordinaire, en particulier la 1-méthylxanthine et le 1-méthylurate, ont montré une activité antioxydante *in vitro* et un pouvoir de réduction du fer *in vivo* supérieur à celui du café décaféiné (**Lee, 2000**).

Cependant, une consommation excessive de caféine peut entraîner des effets indésirables tels que l'augmentation du taux du cholestérol dans le sang, les maladies coronariennes (**Farah, 2012**), les maladies cardiovasculaires, les dépressions et même la dépendance (**Jiang et al., 2014**).

La caféine se forme dans les fruits immatures et s'accumule progressivement au cours du développement de la graine. Pendant ce temps, la transcription et l'activité enzymatique sont importantes dans les fruits immatures et diminuent considérablement au cours des dernières étapes du développement de la graine (Perrois *et al.*, 2015).

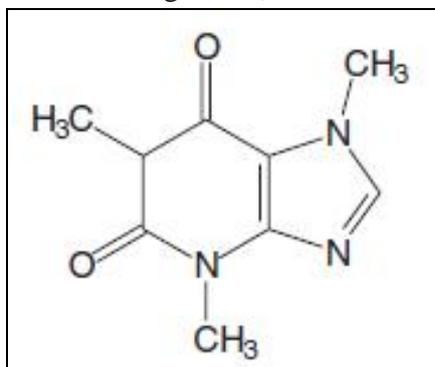


Figure 03 : Structure chimique de la caféine (Farah, 2012).

VI. 1. 2. La trigonelline

La trigonelline (**Figure 04. A**) (C₇H₇NO₂) ou acide 1-*N*-méthylnicotinique, est le deuxième alcaloïde le plus abondant dans les graines de café avec une masse moléculaire de 137,14 g/mol (Haler, 2013). Elle dérive de la méthylation enzymatique de l'acide nicotinique appelé aussi Niacine ou vitamine B₃ (**Figure 04. B**) (Farah, 2012).

Elle constitue un précurseur des différentes classes des composés volatils, tels que les pyrroles et les pyridines qui contribuent aux arômes produits lors de la torréfaction du café (Farah, 2012 ; Cheng *et al.*, 2016).

In vitro, la trigonelline exerce plusieurs activités biologiques, notamment comme agent antimicrobien inhibant la croissance de *Streptococcus mutans*, bactérie étroitement associée au développement de la carie dentaire chez l'homme (Daglia *et al.*, 2002). Elle améliore la mémoire spatiale chez les rats à une concentration de 30 à 100 µmol /L en régénérant les dendrites et les axones dans les neurones corticaux (Tohda *et al.*, 2005).

La trigonelline a montré également un pouvoir inhibiteur de l'invasion des cellules cancéreuses du foie à une concentration de 2,5 à 40 µmol /L (Hirakawa *et al.*, 2005). Allred *et al.* (2009) ont révélé que la trigonelline agit comme un nouveau phytoestrogène; elle stimule la croissance des cellules MCF-7 et cet effet est médié par le réticulum endoplasmique.

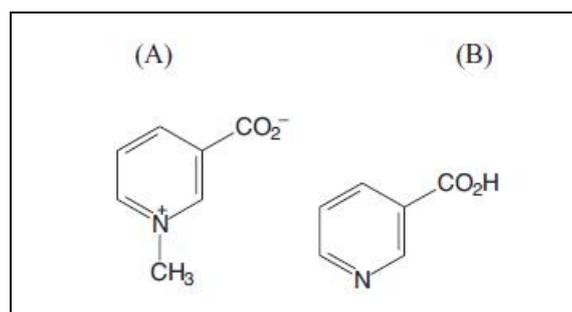


Figure 04 : Structures chimiques de la trigonelline (A) et l'acide nicotinique (B) (Farah, 2012)

VI. 1. 3. La théobromine et la théophylline

La théobromine et la théophylline (**Figure 05**) font partie de la même famille que la caféine « des méthylxanthines », elles sont présentes également dans les grains de *Coffea arabica*, mais en quantités très faibles. La théophylline est le 1,3-diméthylxanthine alors que la théobromine est le 3,7-diméthylxanthine (**Monteiro et al., 2016**).

La théophylline a un usage médical en tant que stimulant du Système Nerveux Central, mais elle est principalement utilisée dans le traitement de maladies respiratoires telles que la maladie pulmonaire obstructive chronique et l'asthme (**Barnes, 2013**). Elle a également une action diurétique provoquée par l'augmentation du débit sanguin rénal et la diminution de la réabsorption tubulaire du sodium et de l'eau (**Bell et al., 1998**).

En combinaison avec l'éthylène diamine, la théophylline exerce un effet bronchodilatateur par relaxation des muscles lisses bronchiques (**Patay et al., 2016a**).

La théobromine possède des avantages liés à son potentiel anti inflammatoire ainsi qu'avec la modulation de réactivité des voies respiratoires (**Martínez-Pinilla et al., 2015**).

La théobromine bloque également les récepteur de l'adénosine (**Martínez-Pinilla et al., 2015**), et a montré une activité significative sur le Système Nerveux Centrale moins importante que celle de la caféine et la théophylline (**Monteiro et al., 2016**).

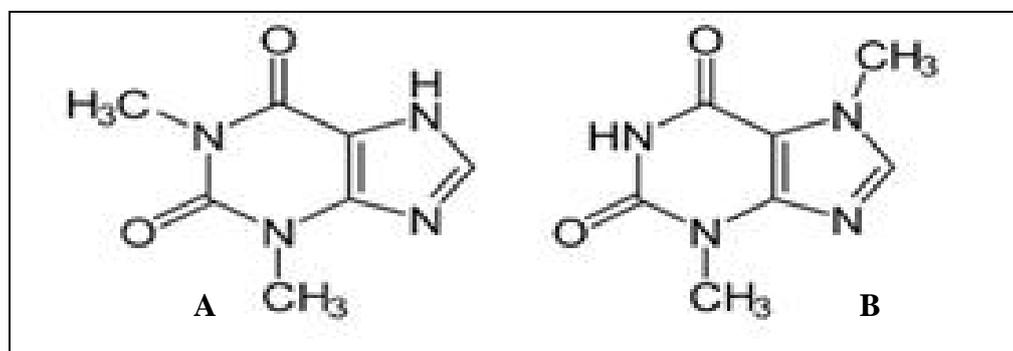


Figure 05 : Structure de la Théophylline (A) et la théobromine (B) (**Monteiro et al., 2016**).

VI. 2. Les polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui sont largement répandus chez les plantes. Ils possèdent un poids moléculaire élevé et ont un rôle important dans les propriétés nutritionnelles et organoleptiques des fruits et végétaux. Dans le café, ils contribuent aux propriétés sensorielles telles que la couleur, l'amertume et le goût (**Mohd Zain et al., 2017**).

Leur structure de base est caractérisée par la présence des groupes hydroxyles associés à des cycles aromatiques. Parmi ces métabolites on cite : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins. Ils sont classés selon la présence des différents substituants sur les noyaux et selon leur degré de saturation (**Mohd Zain et al., 2017**).

Les composés phénoliques sont utilisés dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques pour leurs effets antioxydants, détoxifiants, réducteurs de lipides, cardioprotecteurs, hépatoprotecteurs, anti-inflammatoires, analgésiques, antinéoplasiques, diurétiques, antibactériens, antiviraux, antifongiques, anti-ostéoporotiques, anti-cellulites et anti-âge (**Boros et al., 2010 ; Patay et al., 2016a**).

Les acides chlorogéniques (**Figure 06**) comprennent la grande classe de composés phénoliques. Ils dérivent principalement de l'estérification d'un acide trans-cinnamique (acide caféique, acide férulique et acide p-coumarique) avec l'acide quinique. Ces acides sont subdivisés en fonction de la nature et du nombre de substitutions cinnamiques et de la position d'estérification dans le cycle cyclohexane de l'acide quinique (**Clifford, 2000**). Les esters sont formés préférentiellement avec l'hydroxyle situé sur le carbone en position 5 ainsi que sur les carbones en position 3 et 4, et moins fréquemment avec l'hydroxyle situé sur le carbone 1 (**Farah, 2012**).

L'acide caféoyl-quinique (5-CQA) constitue l'acide chlorogénique *sensu stricto* (**Patay et al., 2016a**), il est le plus abondant dans les graines vertes du café (**Tajik et al., 2017**).

L'acide chlorogénique (5-CQA) est connu pour ses propriétés antioxydantes, anticarcinogènes et anti-inflammatoires ; ces bienfaits pour la santé ont fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques (**Tsuchiya et al., 1996 ; Dos Santos et al., 2006**). Il a été prouvé à avoir des effets bénéfiques sur le diabète de type 2 (**Johnston et al., 2003**), l'obésité (**Thom, 2007**), la maladie d'Alzheimer (**Kwon et al., 2010**), les accidents vasculaires cérébraux (**Lapchak, 2007**) et la fonction endothéliale ainsi que la pression artérielle (**Suzuki et al., 2002 ; Suzuki et al., 2006**). Il améliore les fonctions cognitives,

en particulier les fonctions d'attention, d'exécutif et de mémoire chez les personnes âgées (Kato *et al.*, 2018).

En revanche, l'acide chlorogénique possède des effets indésirables, notamment les maux de tête, la diarrhée et les complications associées à des doses plus élevées chez une personne ayant un estomac sensible (Onakpoya *et al.*, 2010).

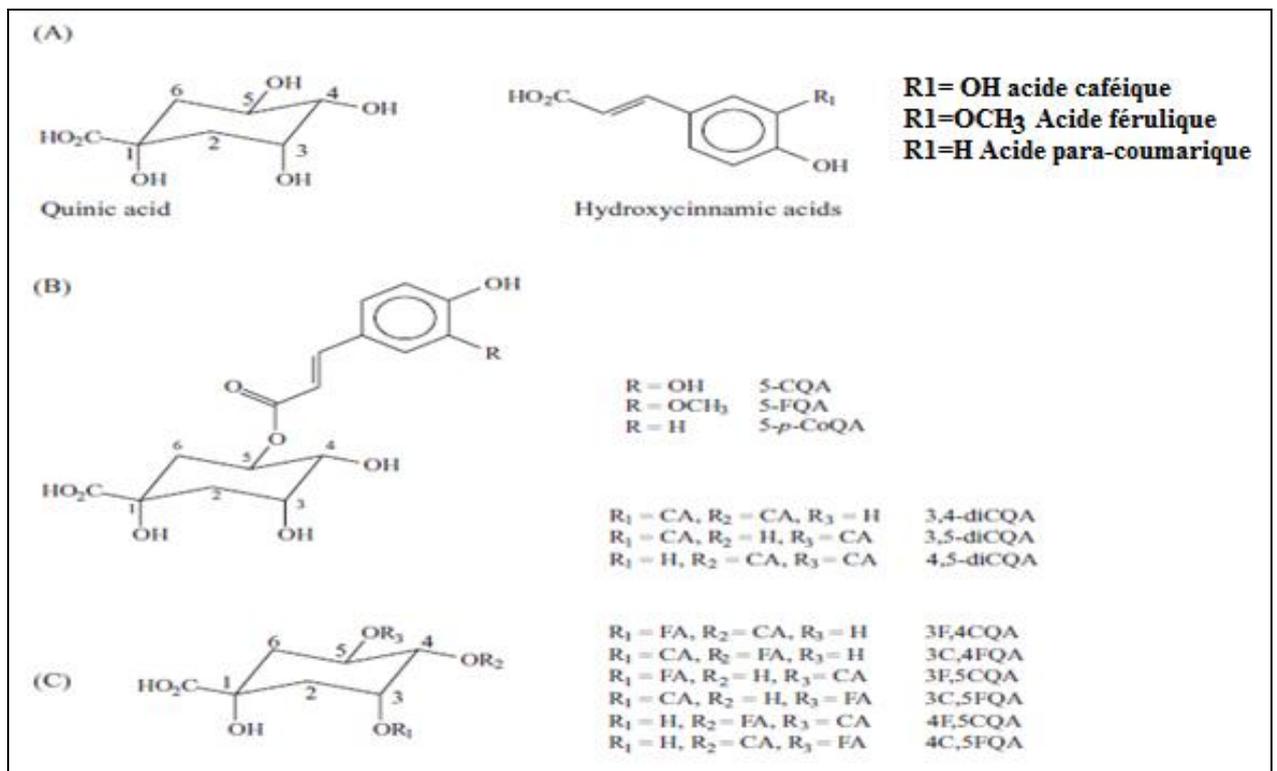


Figure 06 : Acides chlorogéniques et composés apparentés. (A) Composés basiques, (B) monoesters d'acide quinique avec des acides hydroxycinnamiques (exemple des 5-isomères), (C) diesters d'acide quinique avec de l'acide caféique et esters mixtes. diCQA, acides dicaféoylquiniques ; FQA, acides féruloylquiniques; p-CoQA, acides p-coumaroylquiniques (Farah, 2012).

VI. 3. Les terpènes : Cafestol et kahweol

Ils représentent la troisième classe des métabolites secondaires. Ils sont des composés d'origine végétale possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène. Les diterpènes (C₂₀) sont un groupe de composés présents dans la matière insaponifiable du contenu lipidique du café. Ils sont représentés par le kahweol et le cafestol qui sont des alcools penta cycliques (Figure 07) (Farah, 2012). Ils présentent une stabilité relative au traitement thermique (Souza et Benassi, 2012).

Le cafestol possède la formule brute $C_{20}H_{28}O_3$ et le poids moléculaire de 316,44 g/mol alors que la formule brute du Kahweol est $C_{20}H_{26}O_3$ et son poids moléculaire est de 314,42 g/mol (Haler, 2013).

Ces diterpènes se trouvent dans l'ensemble de la plante du caféier (racines, branches, feuilles et fruits), mais principalement dans les fruits, où leur quantité dépend du stade de maturité du fruit (Ivamoto *et al.*, 2017).

Ils sont produits uniquement par des plantes du genre *Coffea*, pour cela ils représentent des marqueurs taxonomiques discriminants entre les espèces du café particulièrement *Coffea arabica* et *Coffea canephora* (Pacetti *et al.*, 2012 ; Novaes, 2018). Le cafestol se trouve chez *Coffea arabica* et *Coffea canephora* (Dias *et al.*, 2010).

Le cafestol est le principal constituant de la fraction insaponifiable de l'huile de café, il est moins sensible face à la chaleur que le Kahweol qui est plus sensible à la chaleur, à l'oxygène, à la lumière et aux acides, et est donc moins abondant (Farah, 2012).

Le Kahweol se distingue du cafestol par une double liaison présente entre les carbones 1 et 2 du noyau A du diterpène (Novaes, 2018).

Ces composés ont montré des propriétés anticancérigènes, antioxydantes, anti inflammatoires et hépato-protectives, cependant ils ont un effet cholestérolémique (Cavin *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2007 ; Guzzo *et al.*, 2015).

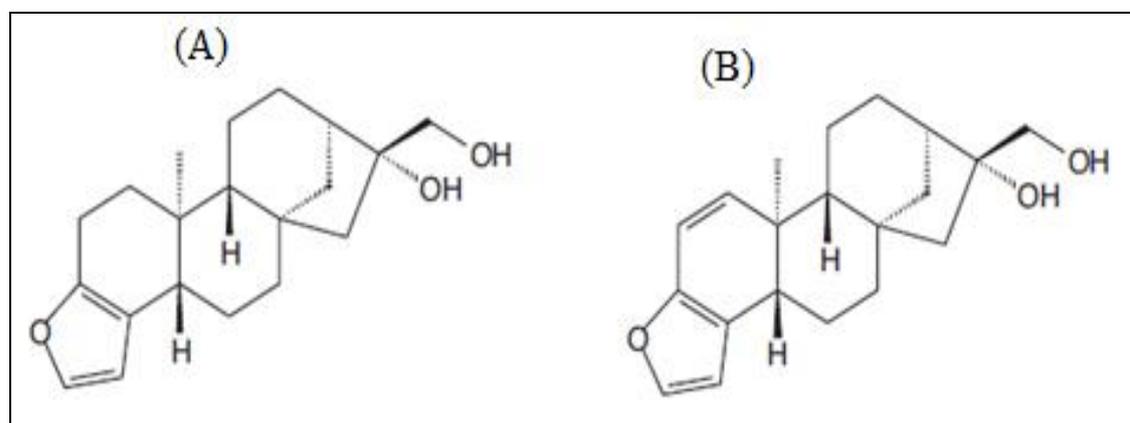


Figure 07 : Structure chimique des diterpènes : Cafestol (A); kahweol (B) (Farah, 2012).

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen.

Cette étude est subdivisée en deux parties :

- La première partie concerne la réalisation des extraits aqueux et hydrométhanolique ainsi que leurs fractions, les dosages quantitatifs des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et les tanins condensés.
- La deuxième partie concerne l'évaluation des activités antioxydante, antibactérienne et antifongique des extraits préparés.

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Dans cette étude nous avons utilisé les graines vertes de café de l'espèce *Coffea arabica*. Les graines ont été importées de l'Ethiopie par la société Afrique café. Ces graines ont été conservées à l'abri de la lumière et à la température ambiante jusqu'à usage.

I.2. Matériel biologique

Le pouvoir antibactérien des différents extraits et leurs fractions a été déterminé vis-à-vis de 14 bactéries de références et trois levures de l'espèce *Candida albicans* (**Tableau 2**).

Les souches étaient disponibles dans le laboratoire Antibiotiques, Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique. Elles ont été entretenues par des repiquages successifs puis conservées à 4°C sur gélose nutritive inclinée.

Tableau 2 : Souches utilisées dans les tests antimicrobiens

	Bactéries	Références
Bactéries	Bactéries à Gram positif	
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC25921
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	Bactéries à Gram négatifs	
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70603
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659	
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC13047	
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790
	<i>Candida albicans</i>	IP444

ATCC: American Type Culture Collection.

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits

Les extraits de départ ont été préparés en infusant 10g des graines vertes du café finement broyées avec 100 mL du solvant bouillit (eau distillée ou hydrométhanol 70/30). Après une heure d'incubation et sous agitation, les extraits ont été filtrés sur papier Whatman n°1 puis concentrés à 60°C.

Une extraction liquide-liquide a été effectuée en utilisant deux solvants : l'acétate d'éthyle et n-butanol.

Les extraits bruts et leurs fractions (acétate d'éthyle et du n-butanol) ainsi que leurs phases résiduelles ont été évaporés à 60°C, à sec et sous vide via un rotavapeur et maintenus au sec pour les analyses ultérieures.

II.2. Rendements de l'extraction

Le rendement des différents extraits a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$R (\%) = (M_1 / M_0) \times 100$$

- R (%) : Rendement en %
- M₁ : Masse de l'extrait sec après l'évaporation du solvant
- M₀ : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction

II.3. Estimation des teneurs en métabolites secondaires

II.3.1. Dosage des phénols totaux

II.3.1.1. Principe

Cette méthode est basée sur la capacité des composés phénoliques à réduire le mélange d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀) et phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) du réactif de folin-ciocalteu, avec la formation d'un complexe bleu qui absorbe à 700 nm (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

II.3.1.2. Mode opératoire

Le dosage des phénols totaux a été effectué selon le protocole décrit par **Vermerris et Nicholson, (2006)**. Un volume de 2 ml du carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 2% a été additionné à 0,1mL de chaque extrait. Après 5 minutes, 0,1mL du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) a été ajouté au mélange. L'ensemble a été incubé à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 700 nm, contre un blanc.

Le contrôle positif a été réalisé en traçant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique à différentes concentrations (0 à 1000 µg/mL).

La teneur en composés phénoliques totaux est exprimée en microgrammes équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg E).

II.3.2. Dosage des flavonoïdes

II.3.2.1. Principe

Cette technique est basée sur l'utilisation d'une solution de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) en milieu basique (NaOH). L'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs entraîne la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm.

II.3.2.2. Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode colorimétrique décrite par **Kim et al. (2003)**. Un volume de 2 mL d'eau distillée a été mélangé avec 500 μL de l'extrait et 150 μL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15%. Après 6 minutes, 150 μL de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10% ont été ajoutés.

Après 6 minutes, 2 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% ont été additionnés puis compléter à 5 mL avec de l'eau distillée. Après 15 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 510 nm.

La catéchine à différentes concentrations (de 0 à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a servie de contrôle positif. La teneur totale en flavonoïdes a été rapportée en microgrammes équivalent de catéchine, par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg E}$).

II.3.3. Dosage des tanins condensés

II.3.3.1. Principe

Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec les tanins condensés, ces derniers se dépolymérisent en présence d'acide concentré et se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurable par spectrophotométrie à 550 nm (**Sun et Richardo-da-Silvia, 1998**).

II.3.3.2. Mode opératoire

La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline décrite par **Julkunen-Titto, (1985)**. Pour cela 50 μL de chaque extrait ont été additionnés à 3 mL de la solution vanilline à 4% et 1,5 mL d'acide chlorhydrique concentré (HCl).

La lecture de l'absorbance a été effectuée à 550 nm par un spectrophotomètre après un temps de réaction de 15 minutes.

Des solutions de la catéchine à différentes concentrations (0 à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont servies de contrôle positif.

Le taux des tanins condensés est exprimé en microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC}/\text{mg E}$).

II.4. Mise en évidence de l'activité antioxydante

II.4.1. Recherche de l'activité anti-radicalaire

II.4.1.1. Principe

Cette technique permet de mettre en évidence la réaction entre les antioxydants avec le radical libre réactif le DPPH. Les antioxydants transfèrent un électron ou un atome d'hydrogène au DPPH (2, 2-diphénylique-1-picrylhydrazyl) qui est de couleur violet-foncé et neutralisent son caractère de radical libre en le réduisant en 2, 2-diphénylique-1-picrylhydrazine avec une décoloration de la couleur violette (**Benariba *et al.*, 2014**).

II.4.1.2. Mode opératoire

Nous avons suivi le protocole décrit par **Sanchez-Morino *et al.* (1998)**. 50 μL de chaque extrait à différentes concentrations (100 à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont été mélangés avec 1950 μL de la solution de DPPH à 0,025 mg/mL . Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, la lecture a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc.

Le contrôle négatif a été préparé par la mise en contact de 50 μL de méthanol avec 1950 μL de DPPH.

Le BHA a été utilisés comme contrôle positif.

Le pourcentage de décoloration du DPPH a été calculé selon l'équation :

$$\text{Décoloration du DPPH (\%)} = [(\text{Abs contrôle}-\text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

II.4.1.3. Calcul des CI_{50}

La CI_{50} est la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les CI_{50} sont calculées graphiquement par les régression linéaires ou logarithmiques des graphes tracés : pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations initiales des extraits testés (**Samarth *et al.*, 2008**).

II.4.2. Recherche du pouvoir réducteur du fer (FRAP)

II.4.2.1. Principe

Cette méthode permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+})

ce qui permet la formation d'une couleur verte. L'intensité de cette dernière est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.

II.4.2.2. Mode opératoire

La technique utilisée dans cette étude est celle décrite par **Karagözler *et al.* (2008)**. 100 µL de chaque extrait à différents concentrations (100 à 1000 µg /mL) ont été mélangés avec 250 µL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 250 µL de la solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Après 20 min d'incubation à 50°C, un volume de 250 µL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% ont été additionnés au mélange puis centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. 500 µL du surnageant ont été prélevés puis mis dans des tubes contenant 500 µL d'eau distillée et 100 µL de $FeCl_3$ à 0,1%. L'absorbance a été mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. Le BHA a été utilisés comme contrôle positif dans les mêmes conditions opératoires.

II.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Dans notre étude l'activité antimicrobienne a été évaluée vis-à-vis 14 souches bactériennes et trois levures de l'espèce *Candida albicans* toutes de références. Les méthodes utilisées ont été inspirées de celles décrites par l'institut des Standards Clinique et des Laboratoires. Nous avons utilisé deux méthodes, la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu liquide.

II.5.1. L'évaluation de l'activité antibactérienne

II.5.1.1. La méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été déterminée par la technique de diffusion sur milieu gélose (**CLSI, 2012**).

L'inoculum a été préparé à partir d'une préculture de 16 à 18 heures. Quelques colonies ont été suspendues dans des tubes stériles contenant de l'eau physiologique (0,9%). L'absorbance comprise entre 0,08 et 0,1 et lue à 625 nm, correspond à 10^8 cellules/ mL (turbidité équivalente au 0,5 McFarland).

En parallèle, des disques stériles de 6 mm de diamètre ont été imbibés par les différents extraits à 512 µg/ disque puis déposés délicatement sur les boites de pétri contenant du Mueller Hinton préalablementensemencées. La lecture a été réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C, par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque (**CLSI, 2012**).

II.5.1.2. La concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice de tous les extraits a été réalisée par la technique des dilutions en milieu liquide sur des microplaques à 96 puits (CLSI, 2012).

Pour cela, une série de dilutions de chaque extrait (10 à 0,019 mg/mL) a été préparée dans la microplaque. L'ensemencement a été effectué en introduisant dans chaque puits 100 µL d'un l'inoculum contenant 10^6 cellules/ mL. Les premiers puits correspondent aux contrôles négatifs. Les derniers puits correspondent aux contrôles positifs. Les microplaques ont été sellées et incubées pendant 24h à 37°C. La CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait testé pour laquelle aucun trouble n'est observé (CLSI, 2012).

II.5.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique des différents extraits des graines de *Coffea arabica* vis-à-vis des levures a été effectuée selon les mêmes étapes précédentes sauf que le milieu utilisé est le Mueller Hinton supplémenté par 2% de glucose et de 0,5 µg/mL de bleu de méthylène et l'inoculum a été fixé dans un intervalle entre 0,12 à 0,15 à 530 nm (CLSI, 2017). Après 24 heures d'incubation à 35°C, la lecture a été effectuée de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

Pour la détermination de la CMI des levures, le milieu utilisé est le Roswell Park Memorial Institute 1640. L'inoculum a été ajusté à 530 nm avec une concentration qui est de $1-5.10^6$ UFC/ mL (CLSI, 2017).

Troisième partie

Résultats et Interprétation

I. Rendements des extraits

Les résultats des rendements et des caractéristiques des extraits sont représentés dans la **figure 08** et le **tableau 3**. Les rendements enregistrés varient entre 0,375 % et 4,77 %. Quantitativement et d'après les résultats, il apparaît que les extraits bruts aqueux et hydrométhanolique ont donné les rendements les plus importants avec les valeurs 4,77 % et 4,6435 % respectivement.

La grande partie des constituants de l'extrait aqueux reste dans la fraction résiduelle aqueuse. Cette fraction a montré un rendement de 2,2%. La fraction acétate d'éthyle de l'extrait aqueux ainsi que la phase résiduelle de l'extrait hydrométhanol donnent les rendements les plus faibles (0,467% et de 0,375% respectivement). Les fractions n-butanol montrent des rendements presque similaires.

Nous remarquons aussi que l'extrait aqueux et ses fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol sont récupérés sous forme de poudre à l'exception de sa phase résiduelle qui est sous forme d'hygroscopique. Tandis que les extraits hydrométhanoliques sont récupérés sous forme de pâte mis à part la fraction n-butanol qui est sous forme de poudre.

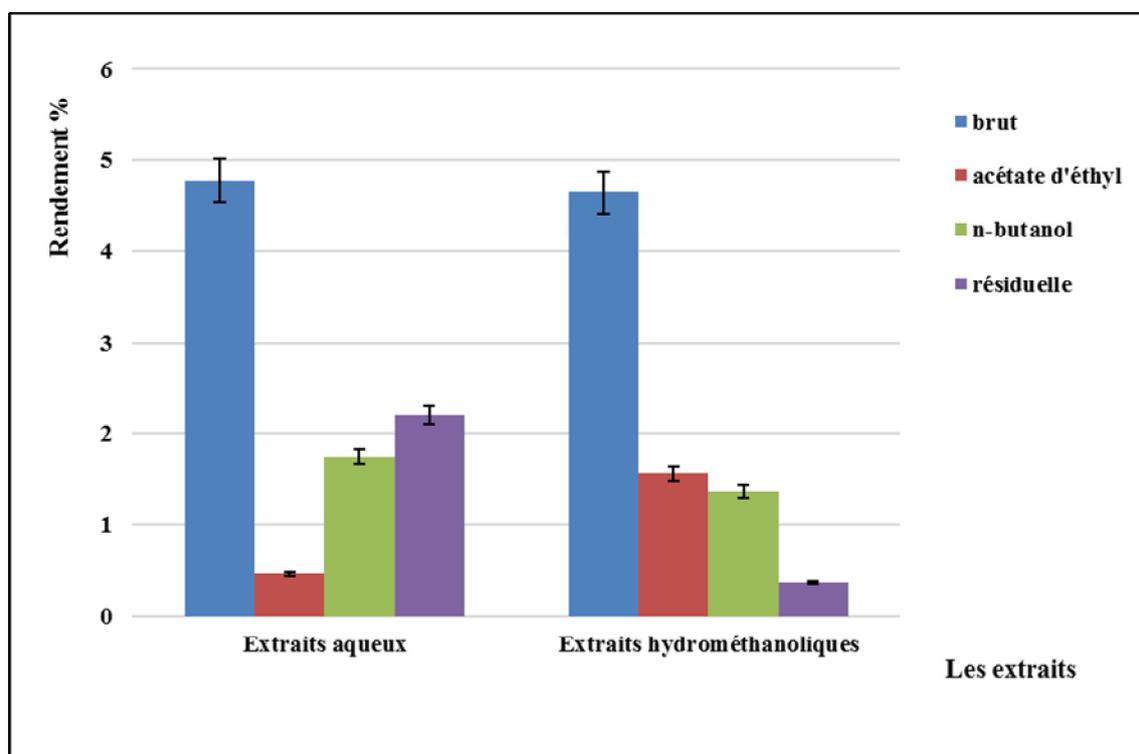


Figure 08 : Rendements des différents extraits des graines vertes de *Coffea arabica*

Tableau 3 : Caractéristiques des différents extraits des graines vertes de *Coffea arabica*

	Extraits aqueux				Extraits hydrométhanoliques			
	Extrait brut	Acétate d'éthyle	n-butanol	Phase résiduelle	Extrait brut	Acétate d'éthyle	n-butanol	Phase résiduelle
Aspect	Poudre	Poudre	Poudre	Pâteux	Pâteux	Pâteux	Poudre	Pâteux
Couleur	Vert militaire	Vert militaire	Jaune	Vert foncé	Marron	Marron	Jaune	Marron
Solubilité	DMSO	DMSO	DMSO	Eau distillée	DMSO	DMSO	DMSO	Eau distillée

II. Teneurs en composés phénoliques

Le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés a été effectué par des méthodes spectrophotométriques en utilisant les réactifs de Folin-Ciocalteu, le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$, et la vanilline respectivement.

II.1. Polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été calculée par extrapolation des valeurs des absorbances obtenues à 700 nm en utilisant l'équation de régression linéaire $y = 0,0019x$ (**Figure 09**). Les valeurs obtenues sont exprimées en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait (μg EAG/mg E).

Les résultats révèlent une différence entre les extraits (**Figure 10**). En effet, les fractions n-butanol des deux extraits aqueux et hydrométhanolique présentent les teneurs en polyphénols les plus élevées, qui sont de 497,33 μg EAG/mg E et 491,86 μg EAG/mg E respectivement.

Nous observons également des teneurs en polyphénols totaux importantes et similaires entre l'extrait aqueux brut (363,93 μg EAG/mg E) et sa phase résiduelle (369,4 μg EAG/mg E) ainsi que dans la phase d'acétate d'éthyle de l'extrait hydrométhanolique (374,63 μg EAG/mg E). En revanche, l'extrait brut hydrométhanolique présente la plus faible teneur en polyphénols totaux, elle est de l'ordre de 275,57 μg EAG/ mg E.

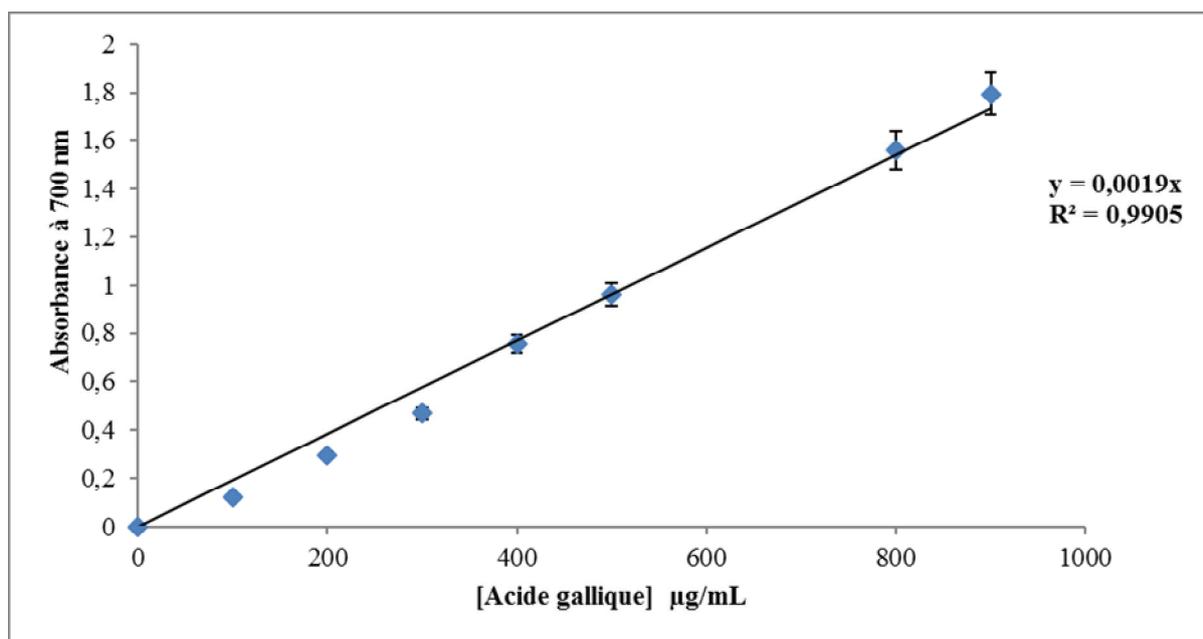


Figure 09 : Courbes d'étalonnage de l'acide gallique pour les polyphénols totaux

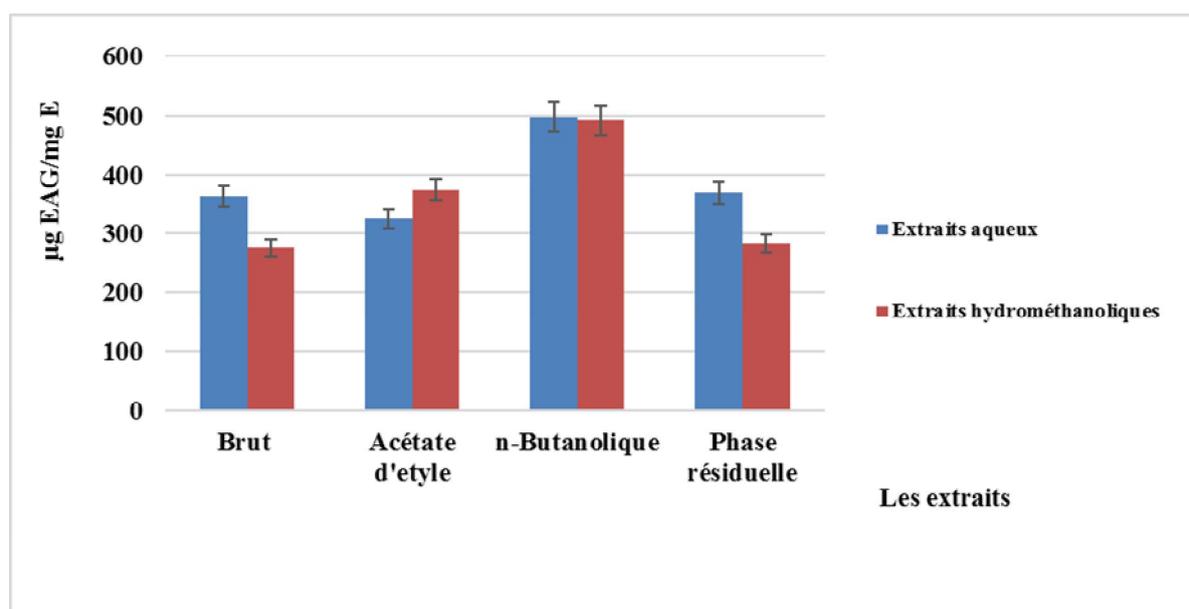


Figure 10 : Représentation des teneurs en polyphénols totaux

II.2. Les flavonoïdes

Les taux des flavonoïdes des extraits et des fractions ont été obtenus par extrapolation des valeurs des absorbances obtenues à 510 nm en utilisant l'équation de régression linéaire $y = 0,002x$ (Figure 11). Les valeurs obtenues sont exprimées en microgramme équivalent de Catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC}/\text{mg E}$).

Les résultats présentés dans la figure 12, montrent que les teneurs en flavonoïdes varient considérablement entre les différents extraits. En effet, la fraction n-butanolique de l'extrait

hydrométhanolique enregistre la concentration la plus importante en flavonoïdes (337,3333 $\mu\text{g EC}/\text{mg E}$), suivie par la fraction acétate d'éthyle de cet extrait et la fraction n-butanolique de l'extrait aqueux avec les teneurs de 291,25 et 273,3833 $\mu\text{g EC}/\text{mg E}$ respectivement. La plus basse concentration en flavonoïdes a été obtenue avec la phase résiduelle de l'extrait hydrométhanol avec une valeur de 113,7166 $\mu\text{g EC}/\text{mg E}$.

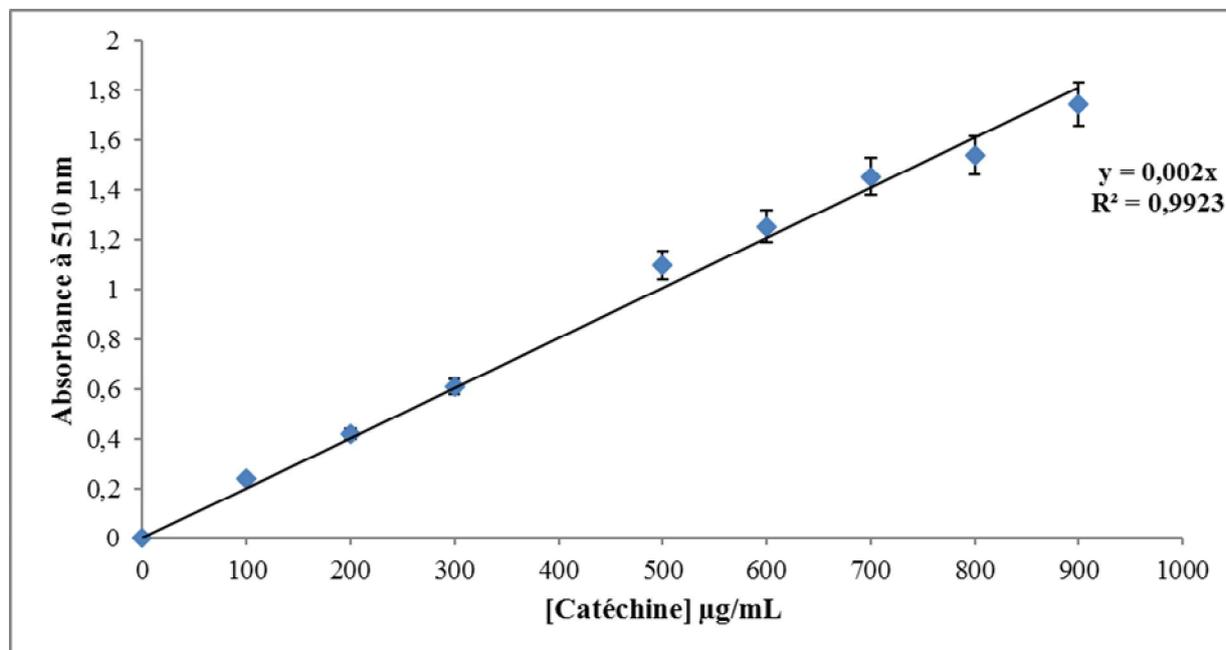


Figure 11 : Courbes d'étalonnage de la catéchine pour les flavonoïdes.

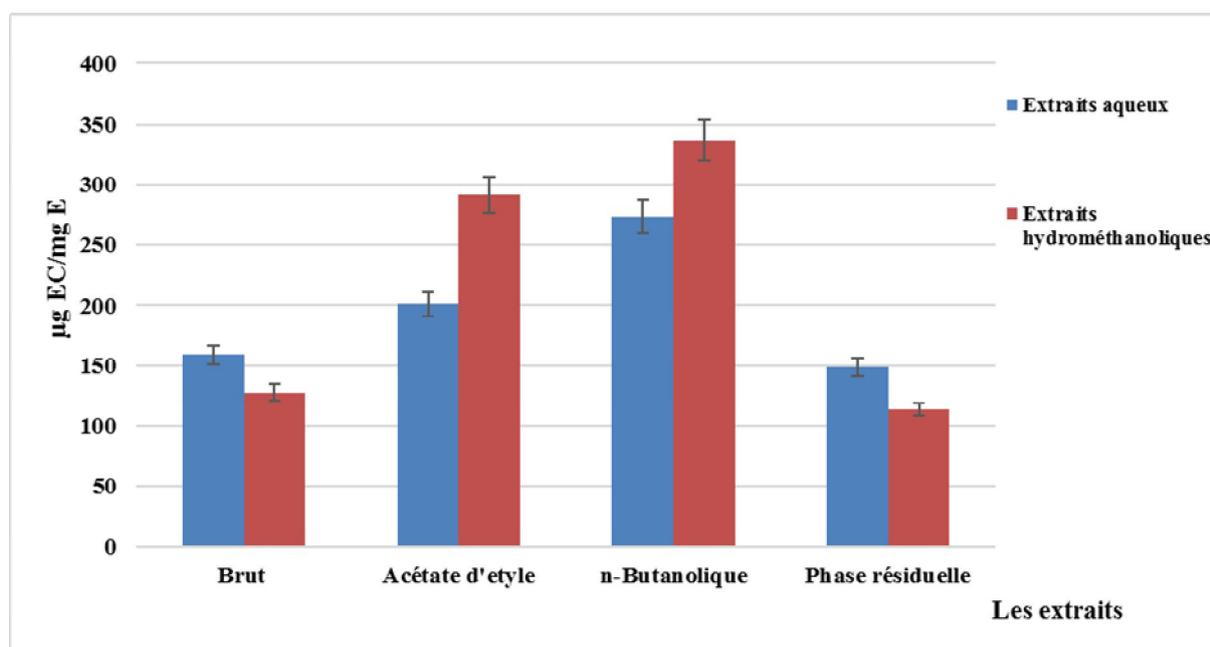


Figure 12 : Représentation des teneurs en flavonoïdes.

II.3. Les tanins condensés

Les teneurs en tanins condensés ont été également déterminées à partir de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant la catéchine. Les résultats ont été calculés à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage $y = 0,0001x$ (Figure 13). Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent de Catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC}/\text{mg E}$) (Figure 14).

Ce dosage révèle que l'extrait brut hydrométhanolique renferme le taux le plus important en tanins condensés, avec une valeur de $412,33 \mu\text{g EC}/\text{mg E}$, suivi par l'extrait aqueux brut qui a donné une teneur de $341,67 \mu\text{g EC}/\text{mg E}$. En revanche, les teneurs les plus faibles ont été enregistrées dans les fractions n-butanolique avec des valeurs similaires de 58 et $56 \mu\text{g EC}/\text{mg E}$ respectivement dans la fraction n-butanolique de l'extrait aqueux et la fraction n-butanolique de l'extrait hydrométhanolique. La phase résiduelle et la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait aqueux enregistrent des teneurs plus importantes que celles de l'extrait hydrométhanolique.

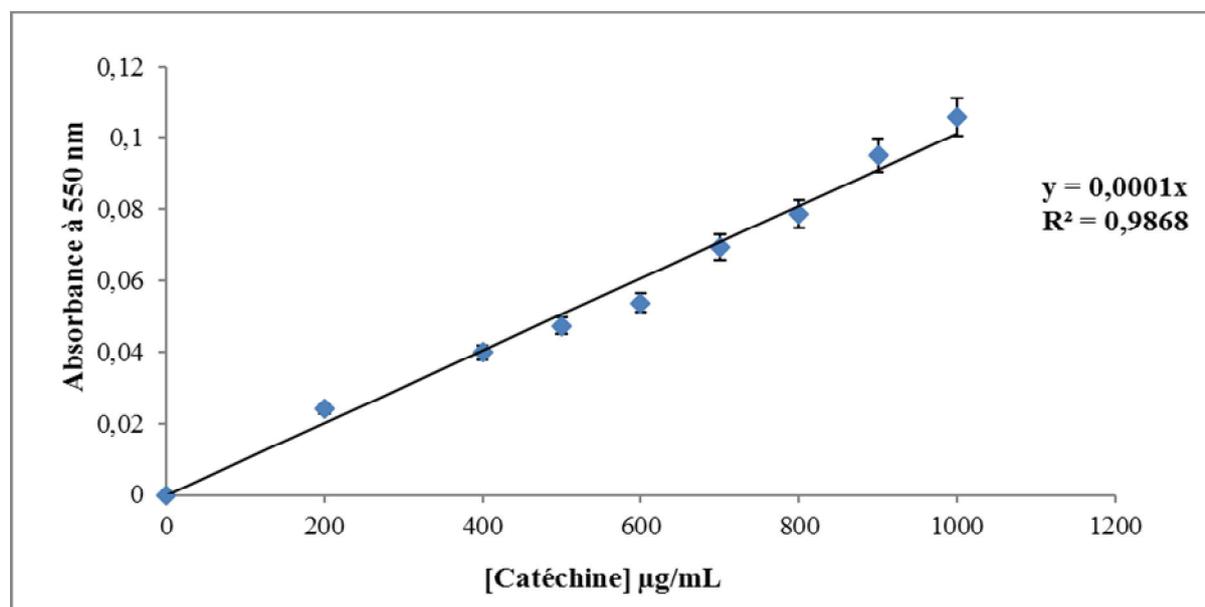


Figure 13 : Courbes d'étalonnage de la catéchine pour les tanins condensés.

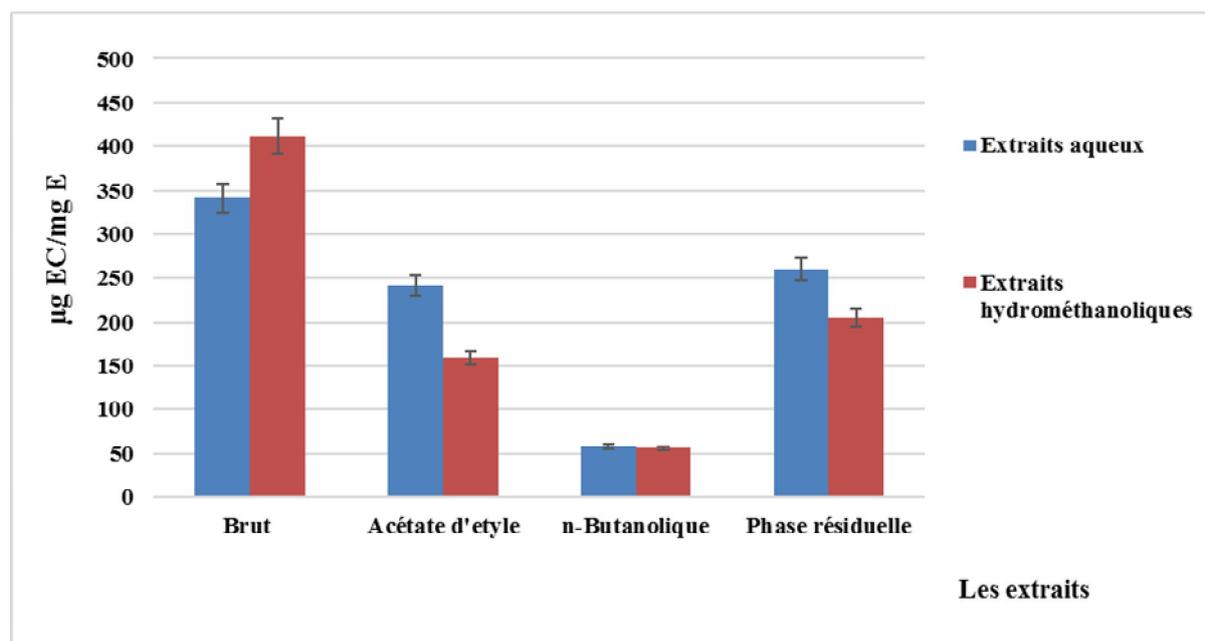


Figure 14 : Représentation des teneurs en tanins condensés.

III. Evaluation de l'activité antioxydante

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits préparés, deux techniques ont été utilisées : la technique de piégeage du radical libre DPPH et la technique de pouvoir réducteur du Fer (FRAP).

III.1. Technique de piégeage du radical libre DPPH

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits (**Figure 15 et 16**) et de standard (**Figure** dans l'annexe)

Nous constatons que tous les extraits exercent un pouvoir inhibiteur du radical libre DPPH. Ce pouvoir augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration des extraits. Le pourcentage d'inhibition le plus important a été enregistré par la fraction n-butanolique de l'extrait aqueux à 1 mg/mL (96,84 %).

Les CI_{50} (concentration inhibitrice à 50%) de BHA et des différents extraits des graines de *Coffea arabica* ont été calculées à partir des courbes logarithmiques. Les valeurs sont illustrées dans le **tableau 4**.

Nous constatons que les extraits aqueux présentent les plus basses CI_{50} comparées par rapport aux extraits hydrométhanoliques. Ces valeurs nous ont révélé également que la fraction n-butanolique de l'extrait aqueux montre l'activité réductrice de DPPH la plus intéressante (0,1844 mg/mL), elle n'est pas très éloignée du BHA qui présente une CI_{50} égale à 0,0792 mg/mL.

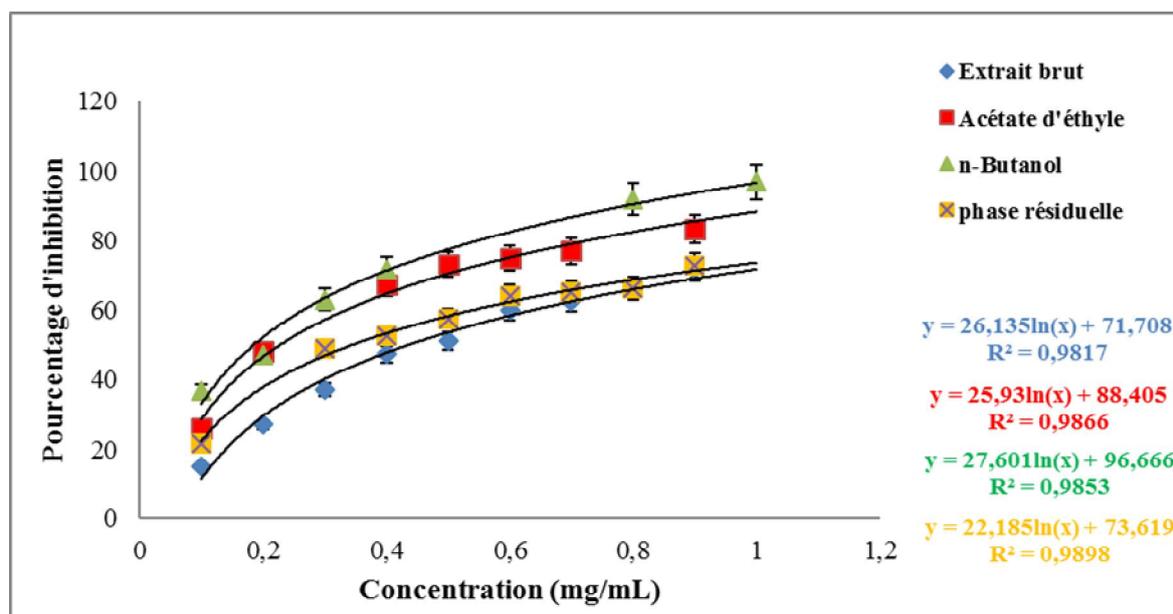


Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des extraits aqueux des graines de *Coffea arabica*.

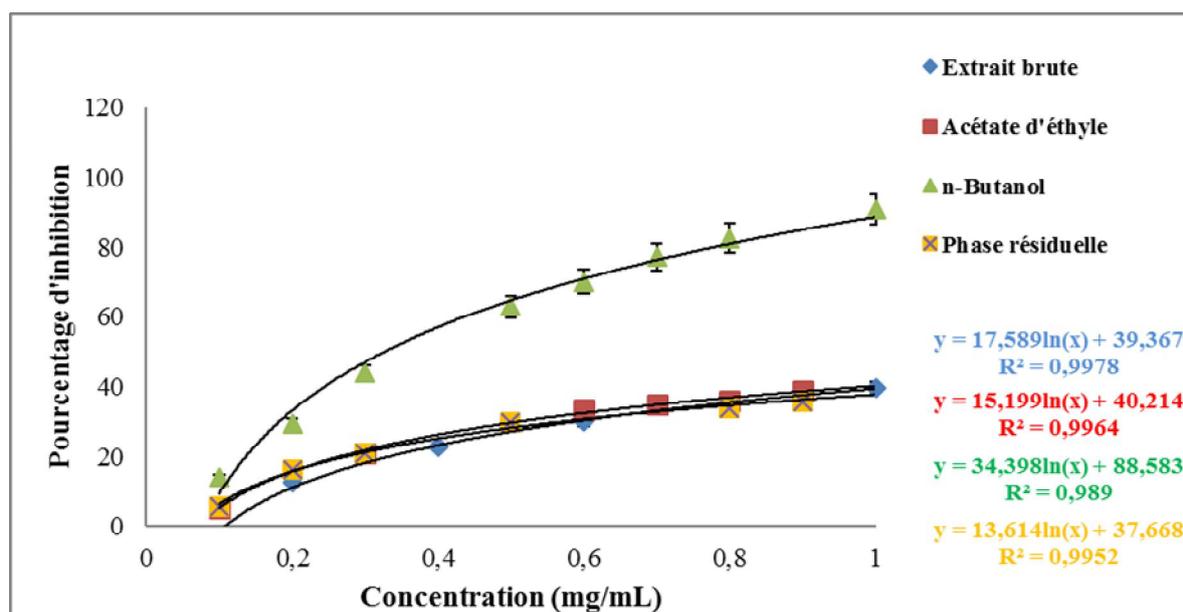


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des extraits hydrométhanoliques des graines de *Coffea arabica*.

Tableau 4 : CI_{50} des extraits aqueux et hydrométhanoliques des graines vertes de *Coffea arabica* ainsi que de standard.

Extraits	Extrait aqueux				Extrait hydrométhanolique				standards
	brut	Acétate d'éthyle	n-butanol	Phase résiduelle	brut	Acétate d'éthyle	n-butanol	Phase résiduelle	BHA
CI_{50} (mg/mL)	0,435 ± 0,064	0,227 ± 0,033	0,184 ± 0,030	0,344 ± 0,036	>1	>1	0,325 ± 0,076	>1	0,079 ± 0,06

III.2. Le pouvoir réducteur du Fer (FRAP)

La deuxième technique utilisée pour évaluer l'activité antioxydante est la technique de FRAP, elle est basée sur la capacité des extraits réduire au fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}).

Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer des courbes linéaires des différents extraits (**Figures 17 et 18**) et de standard (**Figure** dans l'annexe).

Nous remarquons que l'absorbance augmente avec l'augmentation de la concentration de l'ensemble des extraits ce qui correspond à une augmentation du pouvoir réducteur.

A partir de ces courbes linéaires nous avons calculés les EC_{50} de BHA et des différents extraits des graines de *Coffea arabica*. Les valeurs sont représentées dans le **tableau 5**.

D'après les valeurs d' CE_{50} obtenues, nous remarquons que le pouvoir réducteur le plus important est obtenu avec les fractions n-butanoliques. Ces fractions possèdent les EC_{50} les plus basses par rapport aux autres extraits. Cependant, le pouvoir réducteur le plus faible est montré par les phases résiduelles. En comparant les EC_{50} des extraits avec celles du BHA, il apparait qu'elles sont éloignées.

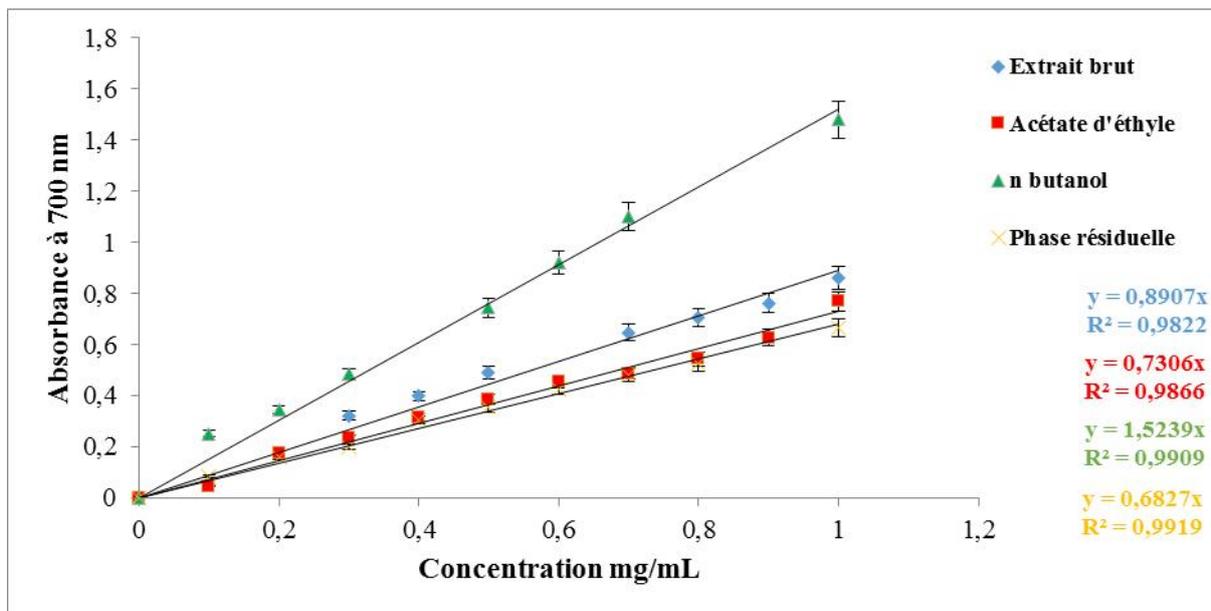


Figure 17 : Evolution des absorbances en fonction des concentrations des extraits aqueux des graines de *Coffea arabica*.

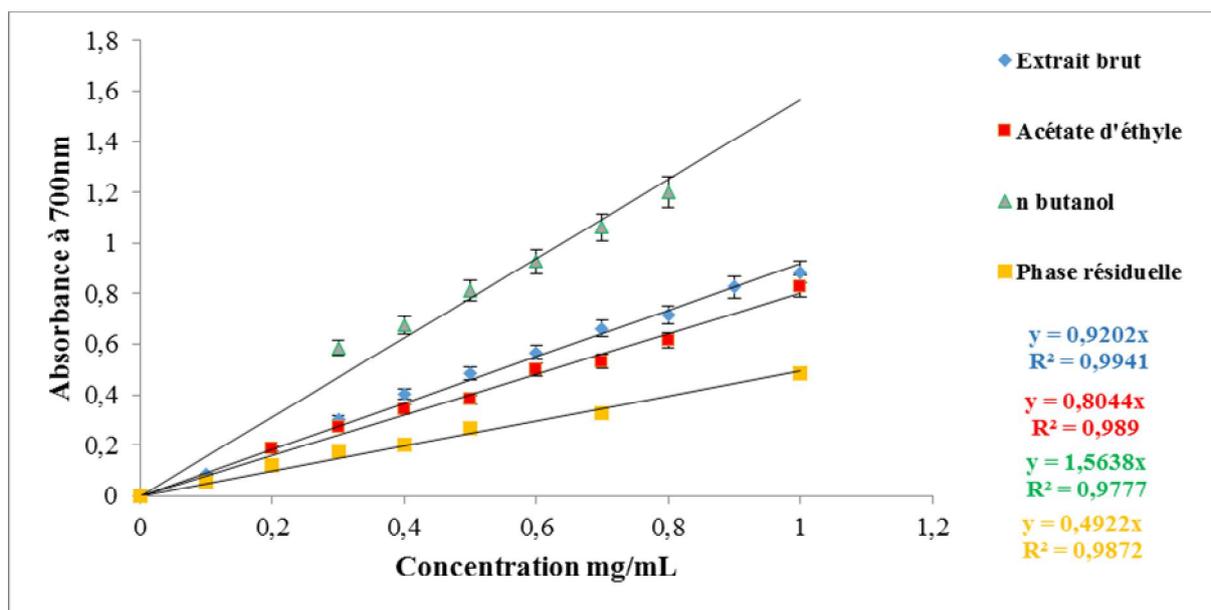


Figure 18 : Evolution des absorbances en fonction des concentrations des extraits hydrométhanoliques des graines de *Coffea arabica*.

Tableau 5 : CE₅₀ des extraits aqueux et hydrométhanoliques des graines vertes de *Coffea arabica* ainsi que le standard.

Extraits	Extrait aqueux				Extrait hydrométhanolique				standards
	brut	Acétate d'éthyle	n-butanol	Phase résiduelle	Brut	Acétate d'éthyle	n-butanol	Phase résiduelle	BHA
CE ₅₀ (mg/mL)	0,561 ±0,060	0,684 ±0,014	0,328 ±0,024	0,732 ±0,043	0,543 ±0,014	0,621 ±0,149	0,319 ±0,019	>1	0,090 ± 0,06

IV. Activités antimicrobiennes

IV.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits des graines vertes de *Coffea arabica* a été évaluée par deux méthodes de références : la technique de diffusion sur milieu gélosé (méthode des disques) et la méthode des microdilutions en milieu liquide pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).

Les diamètres des zones d'inhibition sont représentés dans le **tableau 6**. Nous remarquons que toutes les fractions de l'extrait hydrométhanolique exercent une activité antibactérienne vis-à-vis d'au moins 5 bactéries mis à part la phase résiduelle. Ils agissent vis-à-vis des bactéries à gram négatif et positif avec des diamètres des zones d'inhibitions allant de 6 à 15 mm et de 6 à 18,5 mm respectivement.

La zone d'inhibition la plus élevée (18,5 mm) a été obtenue par l'extrait aqueux vis-à-vis *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

L'activité antibactérienne faible ou absente des extraits peut être expliquée par la résistance des bactéries à ces composés ou carrément les extraits n'avaient pas d'effet vis-à-vis de ces bactéries.

Tableau 6 : Diamètres des zones d'inhibition en mm des extraits des graines vertes de *Coffea arabica*.

Extraits		Extrait aqueux				Extrait hydrométhanol				Gent
		Brut	Acétate. d'éthyle	n-butanol	Phase résiduelle	Brut	Acétate. d'éthyle	n-butanol	Phase résiduelle	
Bactéries à Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6 ± 0	12 ± 1,4	12,5 ± 0,7	6 ± 0	10 ± 1,4	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	12
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	6 ± 0	9 ± 1,4	8 ± 1,4	8 ± 1,4	10,5 ± 0,7	12 ± 0	9 ± 0,7	6 ± 0	22
	<i>Acinetobacter baumani</i> ATCC 19606	8 ± 0	9 ± 1,4	9 ± 0	10 ± 1,4	8,5 ± 0,7	11,5 ± 2,1	6 ± 0	6 ± 0	35
	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	12 ± 1,4	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	9,5 ± 0,7	8,5 ± 0,7	8 ± 0	6 ± 2,1	19
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	10 ± 1,4	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	12,5 ± 2,1	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	18
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	10,5 ± 2,1	11 ± 1,4	11 ± 0	9 ± 1,4	12,5 ± 0,7	12 ± 2,8	6 ± 0	6 ± 0	21
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	10 ± 1,4	8 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	11,5 ± 0,7	6 ± 0	6,5 ± 0,7	6 ± 0	25
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	15 ± 1,4	8 ± 1,4	9 ± 1,4	6 ± 0	12 ± 2,8	10,5 ± 0,7	8 ± 2,8	6 ± 0	22
Bactéries à Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 25921	6 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	8 ± 1,4	6 ± 0	9,5 ± 4,9	7 ± 1,4	6 ± 0	20
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	9,5 ± 4,9	10,5 ± 6,3	6 ± 0	22
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10,5 ± 0,7	6 ± 1,4	9 ± 1,4	9 ± 1,4	10,5 ± 0,7	10 ± 0	8,5 ± 0,7	6 ± 0	32
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	8 ± 1,4	10 ± 1,4	12,5 ± 0,7	6 ± 0	9 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	21
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	18,5 ± 0,7	9 ± 1,4	17 ± 1,4	15 ± 1,4	14,5 ± 0,7	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	22
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	6 ± 0	10 ± 1,4	10 ± 2,8	9 ± 2,8	8,5 ± 0,7	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	22

Dans le but de confirmer les résultats de la technique de diffusion des disques, la concentration minimale inhibitrice a été également recherchée pour les fractions qui ont montré des diamètres des zones d'inhibition supérieures à 6 mm de diamètre. Les résultats sont présentés dans le **tableau 7**.

Nous observons que tous les extraits aqueux et les fractions acétate d'éthyle et n-butanol de l'extrait hydrométhanolique exercent une activité antibactérienne. Les concentrations minimales obtenues sont comprises entre 0,156 à 2,5 mg/mL et 0,312 à 2,5 mg/mL respectivement. L'extrait brut hydrométhanolique, la fraction d'acétate d'éthyle et de

n-butanol de l'extrait aqueux exercent une activité à des concentrations comprise entre 0,625 à 2,5 mg/mL vis-à-vis des bactéries à Gram négatif.

Tableau 7 : Concentrations minimales inhibitrice de l'activité antibactérienne des extraits des graines vertes de *Coffea arabica*.

Extractions	Extrait aqueux mg/mL				Extrait hydro méthanol mg/mL				Gent µg/mL	
	Extrait brut	Acétate d'éthyle	n- butanol	Phase résiduelle	Extrait brut	Acétate d'éthyle	n- butanol	Phase résiduelle		
Bactéries à Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	10	10	-	0,625	-	-	-	0,78
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	0,625	2,5	10	0,625	2,5	2,5	-	0,5
	<i>Acinetobacter boumani</i> ATCC 19606	10	5	10	10	10	10	-	-	0,65
	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	10	-	-	-	10	10	5	-	8
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	10	-	-	-	2,5	-	-	-	0,19
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	10	2,5	10	10	5	10	-	-	2,6
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	10	5	-	-	2,5	-	5	-	0,5
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	10	2,5	2,5	-	5	10	5	-	0,65
Bactéries à Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 25921	-	1,25	10	5	-	10	2,5	-	0,19
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	-	2,5	10	-	0,65
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,156	-	0,312	2,5	5	0,312	2,5	-	0,19
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	10	2,5	10	-	10	-	-	-	2,6
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	10	2,5	2,5	1,25	5	-	-	-	0,12
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-	5	5	2,5	10	-	-	-	0,19

IV.2. Activité antifongique

L'activité antifongique des extraits a été également recherchée par la technique de diffusion des disques sur gélose Muller-Hinton supplémenté. Le **tableau 8** montre les résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm des différents extraits de *Coffea arabica* vis-à-vis des 3 levures de *Candida albicans*.

D'après les résultats, nous observons que l'extrait brut aqueux exerce la meilleure activité antifongique vis-à-vis toutes les levures testées. Les diamètres d'inhibitions sont compris entre 10 et 13,5 mm. L'extrait brut hydrométhanolique présente également un effet antifongique vis-à-vis la levure *Candida albicans* IP444 avec un diamètre de la zone d'inhibition de l'ordre de 13 mm. Il est à noter également que les autres fractions n'exercent aucune activité antifongique.

Tableau 8 : Diamètres des zones d'inhibition en mm de l'activité antifongique des extraits des graines vertes de *Coffea arabica*.

Extrait Levures	Extrait aqueux				Extrait hydro méthanol				Amphotéricine B
	extrait brut	acétate d'éthyle	n butanol	Phase résiduelle	extrait brut	acétate d'éthyle	n butanol	Phase résiduelle	
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	12,5 ±0,7	6 ±0	6 ±0	6 ±0	6 ±0	6 ±0	6 ±0	6 ±0	21,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10 ±1,4	6 ±0	6 ±0	6 ±0	6 ±0	6 ±0	6 ±0	6 ±0	15
<i>Candida albicans</i> IP444	13,5 ±0,7	6 ±0	6 ±0	6 ±0	13 ±1,4	6 ±0	6 ±0	6 ±0	20

Les résultats des CMI vis-à-vis des levures sont représentés dans le **tableau 9**. Nous observons que les extraits bruts exercent une faible activité antifongique avec une CMI de 10 mg/mL.

Tableau 9 : Concentration minimales inhibitrice de l'activité antifongique des extraits des graines vertes de *Coffea arabica*.

Extrait Levures	Extrait aqueux brut mg/mL	Extrait hydrométhanolique brut mg/mL	Amphotéricine B µg/mL
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	10	-	8
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10	-	4
<i>Candida albicans</i> IP444	10	10	2

Discussion générale

Discussion générale

Cette étude a pour objectif l'étude du screening phytochimique et des activités biologiques des graines vertes du café de l'espèce *Coffea arabica*.

Deux solvants polaires ont été utilisés pour l'extraction : l'eau et l'hydrométhanol (70 :30 v/v). Chaque extrait a servi pour préparer des fractions en utilisant deux autres solvants l'acétate d'éthyle et le n-butanol. L'acétate d'éthyle et le n-butanol nous ont permis une séparation et aussi un épuisement de la charge en métabolites contenus dans les extraits bruts. Chaque fraction comprend un ou plusieurs types moléculaires, qui sont soit solubles dans l'acétate d'éthyle (fraction d'acétate d'éthyle), soit solubles dans le n-butanol (fraction n-butanolique). Les métabolites, qui ne sont ni entraînés par l'acétate d'éthyle ni par le n-butanol constituent la phase résiduelle.

En total, deux extraits et 6 fractions ont été obtenus : les extraits bruts aqueux et hydrométhanolique, les fractions d'acétate d'éthyles aqueuse et hydrométhanolique, les fractions n-butanol aqueuse et hydrométhanolique et les phases résiduelles aqueuse et hydrométhanolique.

Les résultats des rendements obtenus étaient très variés. L'extrait aqueux a donné le rendement le plus élevé. Nos résultats concordent avec une étude antérieure réalisée sur des extraits obtenus par macération des graines vertes de *Coffea arabica*. Ce travail a montré également que l'extrait aqueux a donné le rendement le plus important (23,26 %) par rapport à l'extrait hydrométhanolique (12,15%) (**Benramdane, 2017**).

Kiattisin et ses collaborateurs, ont trouvé que les extraits hexane et éthanol obtenus par macération des graines vertes de *Coffea arabica* avaient des couleurs jaunes et les rendements 4,82 et 1,93 % respectivement (**Kiattisin et al., 2016**). Ce qui en accord avec notre travail.

Il est admis que les rendements varient en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, la nature des métabolites de chaque espèce, la méthode d'extraction et la polarité du solvant utilisé dans l'extraction ou dans le fractionnement.

Nous avons ensuite déterminé les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins condensés de toutes les fractions en utilisant des méthodes spectrophotométriques. Nous pouvons dire que les graines vertes du café de notre espèce *Coffea arabica* sont riches en ces métabolites secondaires. En comparant entre les extraits bruts aqueux et hydrométhanolique, nous constatons la richesse de l'extrait aqueux en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Les extraits aqueux ont montré les taux les plus élevés en polyphénols totaux mis à part pour la fraction d'acétate d'éthyle. **Kiattisin et al., (2016)**, ont trouvé des teneurs moins importantes que les nôtres dans les extraits hexane et éthanol obtenus par macération des

Discussion générale

graines vertes de *Coffea arabica* et *Coffea robusta*. Les extraits éthanoliques des graines vertes de *Coffea arabica* et de *Coffea robusta* présentent des teneurs de 255,99 mg EAG/g E et 238,94 mg EAG/g E, respectivement. En revanche, leur contenu en composés phénoliques totaux dans les extraits d'hexane n'était pas détectable. Ce résultat a été confirmé par **Perdani et al. (2019)** sur des espèces de *Coffea arabica* et *Coffea robusta*, d'origine géographiques différentes.

Les résultats obtenus avec les flavonoïdes sont supérieurs à ceux obtenus par **Nayeem et al. (2011)** réalisées avec les feuilles de *Coffea arabica*, la teneur en flavonoïdes était de l'ordre de 10,90 µg EC/mg E. Cependant, nos taux en flavonoïdes sont moins importants par rapport à ceux obtenus avec les extraits aqueux et hydrométhanolique (402,1 et 704,83 µg EC/mg E) rapportés dans l'étude de **Benramdane (2017)**.

De même, nos extraits bruts hydrométhanolique et aqueux ont montré des taux de tanins condensés plus importants (139,75 µg EC/mg E pour l'extrait aqueux et de 276,44 µg EAG/mg E pour l'extrait hydrométhanolique) que ceux obtenus par **Benramdane (2017)**. Nos valeurs sont également plus élevées (0,7µg EC/mg E) que celle trouvées par **Andrade et al. (2012)** dans l'extrait éthanolique des graines vertes de *Coffea arabica* obtenu par Ultrasonication.

La variabilité dans la composition chimique des graines de *Coffea arabica* peut être due à l'influence de plusieurs facteurs. **Daniel et Workneh (2017)** ont rapporté que plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques dans le café, tels que les facteurs extrinsèques (origines géographiques, climatiques), l'expression des gènes, mais également le stade de maturation de la plante et la durée du stockage des grains de café. Ces teneurs dépendent également du mode d'extraction, la durée d'extraction et la polarité du solvant utilisé (**Haddoudi et al., 2014 ; Zlotek et al., 2016**). **Perdani et al. (2019)** ont confirmé également l'effet de la région de culture sur la composition chimique des graines vertes de café (Arabica et Robusta).

Les composés phénoliques possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* : antibactériennes, anticancérigène, anti-inflammatoire, antioxydante etc... Ces activités sont fortement liées à leur caractère réducteur. Les composés phénoliques présentant donc des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Comme nos extraits sont riches en composés phénoliques, cela nous a poussés à évaluer leur activité antioxydante via deux techniques : le piégeage du radical libre (DPPH) et la réduction

Discussion générale

du fer (FRAP). Nous avons constaté que tous les extraits exerçaient un pouvoir inhibiteur du radical libre (DPPH). Ce pouvoir augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration des extraits. Le pourcentage d'inhibition le plus important a été enregistré par la fraction n-butanolique de l'extrait aqueux à 1 mg/mL (96,84 %). Ce résultat est en cohérence avec celui obtenu par **Affonso et al. (2016)** avec l'extrait aqueux (96,21%). De plus les travaux de **Sentkowska et al. (2016)** effectués sur les extraits aqueux des espèces Arabica et Robusta ont montré des pourcentages d'inhibition nettement faibles (1,2 et 2,9 %) par rapport aux nôtres (15,22 et 71,79 %).

Le calcul des CI_{50} nous a permis d'avoir des résultats confirmés par les travaux de **Daniel et Workneh (2017)**. Ces derniers ont montré que les activités antioxydantes des plantes sont attribuées à la présence des composés phénoliques. Dans notre étude la phase n-butanol de l'extrait aqueux a exhibée le pouvoir d'inhibition du DPPH le plus important. Cette phase possède des teneurs très importantes en polyphénols totaux et en flavonoïdes et très faibles en tannins condensés. Les CI_{50} obtenues sont supérieures à celles obtenues par **Vignoli et al. (2011)** et **Duangjai et al. (2016)**, pour les extraits aqueux des graines vertes de *Coffea arabica*.

L'activité antioxydante a été aussi évaluée par la technique de FRAP. Elle est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Nous avons constaté que les extraits ont montré une dose/réponse avec leur pouvoir réducteur.

Le calcul de la EC_{50} nous a montré que le pouvoir réducteur le plus important (valeur la plus basse) est obtenu par les fractions n-butanol. Cependant, le pouvoir réducteur le plus faible est divulgué par les phases résiduelles. Dans leur étude, **Daniel et Workneh (2017)** ont montré qu'il existe une forte corrélation entre la teneur en composés phénoliques totaux et le dosage du pouvoir réducteur ferrique, ce qui explique le pouvoir réducteur important observé dans nos fractions n-butanol, étant donné elles possèdent les teneurs les plus importantes en composés phénoliques totaux.

Selon certains auteurs, les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne (**Taguri et al., 2006**). Ainsi, il a été montré que les catéchines inhibent la croissance de microorganismes en altérant des fonctions membranaires des pathogènes, les détruisant à plus ou moins long terme (**Fukai et al., 1991**).

Les propriétés antibactériennes et antifongiques de nos extraits ont été donc mises en évidence à travers la technique de diffusion des disques et la technique des microdilutions.

Discussion générale

Beaucoup d'études se sont intéressées au pouvoir antibactérien des extraits des graines de *Coffea arabica*. **Duangjai et al. (2016)** ont montré que l'extrait aqueux de la pulpe des graines vertes de *Coffea arabica* avait des activités antibactériennes variées vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

MELSayed et al. (2018) ont également rapporté le pouvoir antibactérien de l'extrait aqueux des graines vertes de *Coffea arabica* vis-à-vis de la souche multirésistante *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Nos résultats ont montré une activité antibactérienne très forte avec des diamètres d'inhibition compris entre 13 et 20 mm et des concentrations minimales inhibitrices allant jusqu'à 0,2 mg / mL.

L'effet antibactérien montré par notre espèce est dû certainement à la présence des polyphénols notamment les flavonoïdes et les tanins qui sont connus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (**Basli et al., 2012**).

Cependant, dans l'étude de **Abdallah (2018)**, l'extrait hydrométhanolique des graines vertes de *Coffea arabica* d'origine Yéménite n'a montré aucune antimicrobienne. Cette faible activité a été expliquée par le fait que l'éthanol n'est pas le solvant adéquat pour l'extraction des molécules à effet antimicrobien.

En plus, **Rakatam et al. (2018)** ont rapporté l'efficacité de l'extrait éthanolique des graines de *Coffea arabica* à inhiber la croissance de *C. albicans* ATCC 90028 et des *C. albicans* isolées à partir des patients ayant une candidose Vulvovaginite. Ces auteurs ont constaté que la concentration de l'extrait affecte la vitesse de diffusion et plus la concentration d'extrait est grande, plus le pouvoir inhibiteur est important. Malheureusement, dans notre étude, nous n'avons pas obtenu un effet antifongique fort. Résultat qui laisse à penser que les composants à activité antifongique sont de nature plutôt apolaire que polaire.

Quatrième partie

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette étude a été menée dans le but de rechercher le contenu en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés et d'évaluer les activités antioxydante, antibactérienne et antifongique des différents extraits des graines vertes de *Coffea arabica*.

Les dosages réalisés sur les différents extraits ont révélé la présence de différentes classes de composés phénoliques : Phénols Totaux, flavonoïdes et tannins condensés avec des concentrations importantes mise à part les fractions n-butanoliques qui sont pauvres en tannins.

L'activité antioxydante vis-à-vis du radical libre DPPH a montré que tous les extraits aqueux ont un pouvoir anti radicalaire important avec des CI_{50} intéressantes et qui ne sont pas trop éloignées de celle de l'acide ascorbique. Cependant, les CI_{50} des extraits hydrométhanoliques, à l'exception de celle de sa fraction n-butanol, sont plus élevés que celles des extraits aqueux. Les fractions n-butanol exercent un pouvoir réducteur du fer similaire et le plus importants par rapport aux autres extraits.

L'extrait brut et la fractions n-butanol de l'extrait aqueux ont révélé des CMI intéressantes (0,156 et 0,312 mg/mL) vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Également, la fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut a montré la CMI 0,625 mg/mL vis-à-vis *Escherichia coli* ATCC 8739. L'extrait brut hydrométhanolique présente également des CMI intéressantes de 0,625 mg/mL vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 8739 et sa fraction d'acétate d'éthyle agit à une CMI de 0,312 mg/mL vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

La recherche de l'activité antifongique n'était pas très intéressante dans cette étude.

D'après nos résultats, nous pouvons conclure que les graines de *Coffea arabica* peuvent constituer une source de composés naturels à potentiels antioxydant et antibactérien très prometteurs en thérapeutique.

Cependant, pour obtenir une vue précise sur l'activité antioxydante, il est nécessaire de réaliser une étude *in vivo* pour vérifier l'efficacité de ces composés dans l'organisme et démontrer la possibilité et le mode de leur utilisation thérapeutique. Également, pour avoir une bonne activité, il est souhaitable de tester plusieurs solvants de polarités différentes pour l'extraction.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdallah E. M. (2018).** Preliminary screening for antibacterial activity of *Coffea arabica* beans (roasted and unroasted) against different pathogens. *Journal of Biotechnology and Biosafety*, 6: 532-537.
- Abdelhalim A., Aburjai T., Hanrahan J. and Abdel-Halim H. (2017).** Medicinal Plants Used by Traditional Healers in Jordan, the Tafila Region. *Pharmacognosy Magazine*,13: 95-101.
- Affonso R. C. L., Voytena A. P. L., Fanan S., Pitz H., Coelho D. S., Horstmann A. L., Pereira A., Uarrota V. G., Hillmann M. C., Calbusch L. A. V., Ribeiro-do-Valle R. M. and Maraschin M. (2016).** Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effect of the Aqueous Extract of Coffee (*Coffea arabica* L.) Bean Residual Press Cake on the Skin Wound Healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 1-10.
- Allred K. F., Yackley K. M., Vanamala J. and Allred C. D. (2009).** Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans. *The Journal of Nutrition*, 139: 1833-1838.
- Andrade K. S., Gonçalves R. T., Maraschin M., Ribeiro-do-Valle R. M., Martínez J. and Ferreira S. R. (2012).** Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, 88: 544-552.
- Babova O., Occhipinti A. and Maffei M. E. (2016).** Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry*, 123: 33-39.
- Baeza G., Benavent M. A., Sarrià B., Goya L., Mateos R. and Bravo L. (2014).** Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protects human HepG2 cells against oxidative stress. *Food Research International*, 62: 1038-1046.
- Ballesteros L. F., Cerqueira M. A., Teixeira J. A. and Mussatto S. I. (2015).** Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment. *Carbohydrate Polymers*, 127: 347-354.
- Barnes P. J. (2013).** Theophylline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188: 901-906.
- Basli A., Chibane M., Madani K. and Oukil N. (2012).** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10: 2-9.

Références bibliographiques

- Belayneh A. and Bussa N. F. (2014).** Ethnomedicinal plants used to treat human ailments in the prehistoric place of Harla and Dengego valleys, eastern Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10: 18.
- Belitz H.D., Grosch W. and Schieberle P. (2009).** Coffee, tea, cocoa. In: *Food chemistry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp. 938-970.
- Bell M., Jackson E., Mi Z., McCombs J. and Carcillo J. (1998).** Low-dose theophylline increases urine output in diuretic-dependent critically ill children. *Intensive Care Medicine*, 24:1099-1105.
- Benariba N., Djaziri R., Bellakhdar W., Belkacem N., Kadiata M., Malaisse W. J. and Sener A. (2013).** Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3: 35-40.
- Benramdane H. (2017).** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits des graines de *Coffea arabica*. Mémoire de Master. Université de Tlemcen. Algérie. pp. 31-40.
- Bertrand B., Montagnon C., Georget F., Charmetant P. and Etienne H. (2012).** Création et diffusion de variétés de caféiers Arabica : quelles innovations variétales ? *Cahiers Agricultures*, 21: 77-88.
- Bhupathiraju S. N., Pan A., Malik V. S., Manson J. E., Willett W. C., Van Dam R. M. and Hu F. B. (2012).** Caffeinated and caffeine-free beverages and risk of type 2 diabetes. *American journal of clinical nutrition*, 97:155-66.
- Bla K. B., Trebissou J. N. D., Bidie A. P., Assi Y. J., Zirihi-Guede N. and Djaman A. J. (2015).** Étude ethnopharmacologique des plantes antipaludiques utilisées chez les Baoulé-N'Gban de Toumodi dans le Centre de la Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 85: 7775– 7783.
- Boros B., Jakabová S., Dörnyei Á., Horváth G., Pluhár Z., Kilár F. and Felinger A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217: 7972-7980.
- Cano-Marquina A., Tarín J. J. and Cano A. (2013).** The impact of coffee on health. *Maturitas*, 75:7-21.
- Cavin C., Holzhaeuser D., Scharf G., Constable A., Huber W. W. and Schilter B. (2002).** Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1155-1163.

Références bibliographiques

- Cheng B., Furtado A., Smyth H. E. and Henry R. J. (2016).** Influence of genotype and environment on coffee quality. *Trends in Food Science and Technology*, 57: 20-30.
- Clifford M. N. (2000).** Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism, *Journal of Science of Food and Agriculture*, 80: 1033-1043.
- CLSI (2012).** Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Ninth Edition. Pennsylvania, USA.
- CLSI (2017).** Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. Fourth Edition, CLSI document M27, Wayne, PA.
- Daglia M., Tarsi R., Papetti A., Grisoli P., Dacarro C., Pruzzo C. and Gazzani G. (2002).** Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1225-9.
- Daniel A. and Workneh M. (2017).** Determination of total phenolic content and antioxidant activities of five different brands of Ethiopian coffee. *International Journal of Food and Nutrition Research*, 1:2.
- Davis A. P., Tadesse W. G., Susana B. and Justin M. (2012).** The Impact of Climate Change on Indigenous Arabica Coffee (*Coffea arabica*): Predicting Future Trends and Identifying Priorities. *PLoS One*, 7: 479-81.
- Davis A. P., Tosh J., Ruch N. and Fay M. F. (2011).** Growing coffee: *Psilanthus* (*Rubiaceae*) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 167: 357- 377.
- Del Castillo M. D., Ames J. M. and Gordon M. H. (2002).** Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3698-3703.
- Dias R. C. E., Campanha F. G. A., Vieira L. G. E., Ferreira L. P., Pot D., Marraccini P. and Benassi M. T. (2010).** Evaluation of Kahweol and Cafestol in *Coffee* Tissues and Roasted *Coffee* by a New High-Performance Liquid Chromatography Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 88-93.

Références bibliographiques

- Dibong S. D., Mpondo M. E., Ngoye A., Kwin M. F. and Betti J. L. (2011).** Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37: 2496 - 2507.
- Din N., Mpondo E., Dibong S. D., Kwin N. F. and Ngoye A. (2011).** Inventory and identification of plants used in the treatment of diabetes in Douala town (Cameroon). *European Journal of medicinal plant*, 1: 60-73.
- Dong W., Tan L., Zhao J., Hu R. and Lu M. (2015).** Characterization of Fatty Acid, Amino Acid and Volatile Compound Compositions and Bioactive Components of Seven Coffee (*Coffea robusta*) Cultivars Grown in Hainan Province, China. *Molecules*, 20: 16687-708.
- Dos Santos M. D., Almeida M. C., Lopes N. P and De Souza G. E. P. (2006).** Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 2236-2240.
- Duangjai A., Suphrom N., Wungrath J., Ontawong A., Nuengchamnong N. and Yosboonruang A. (2016).** Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integrative Medicine Research*, 5: 324-331.
- Farah A. (2012).** Coffee constituents. In: *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. 1st ed. Edited by Yi-Fang Chu. John Wiley and Sons; New Jersey, 21-58.
- Fukai K., Ishigami T. and Hara Y. (1991).** Antibacterial activity of tea polyphenols against phytopathogenic bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55:1895-1897.
- Grandjean P. and Tulet J. C. (2000).** Le café, culture exemplaire du Brésil. In: Caravelle, n°75. Nouveaux Brésils – Fin de siècle. pp. 93-108.
- Guzzo L. S., Romero T. R. L., Queiroz-Junior C. M., Caliaro M. V., Azevedo A. O., Perez A. C. and Duarte I. D. G. (2015).** Involvement of endogenous opioid peptides in the peripheral antinociceptive effect induced by the coffee specific diterpene kahweol. *Pharmacological Reports*, 67:1010–1015.
- Haddoudi M., Mellouk H., Bejjany B., Dani A., and Digua K. (2014).** Valorisation du marc du café: extraction de l'huile et évaluations de son activité antioxydante. *Technology de laboratoire*, 8 : 29-37.
- Haler P. N. G. (2013).** Le café : les effets bénéfiques et néfastes sur la santé. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Lorraine- Luxembourg. pp. 42-48.

Références bibliographiques

- Hirakawa N., Okauchi R., Miura Y. and Yagasaki K. (2005).** Anti-Invasive Activity of Niacin and Trigonelline against Cancer Cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69: 653-658.
- Ivamoto S. T., Sakuray L. M., Ferreira L. P., Kitzberger C. S. G., Scholz M. B. S., Pot D., Leroyd T., Vieirae L. G. E., Domingues D. S. and Pereira L. F. P. (2017).** Diterpenes biochemical profile and transcriptional analysis of cytochrome P450s genes in leaves, roots, flowers, and during *Coffea arabica* L. fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111: 340–347.
- Jeszka-Skowron M., Sentkowska A., Pyrzyńska K. and De Peña M. P. (2016).** Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*, 242: 1403-1409.
- Jeszka-Skowron M., Zgola-Grześkowiak K. and Grześkowiak T. (2015).** Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. *European Food Research and Technology*, 240: 19-31.
- Jiang L., Ding Y., Jiang F., Li L. and Mo F. (2014).** Electrodeposited nitrogen-doped graphene/carbon nanotubes nanocomposite as enhancer for simultaneous and sensitive voltammetric determination of caffeine and vanillin. *Analytica Chimica Acta*, 833: 22-28.
- Johnston K. L., Clifford M. N. and Morgan L. M. (2003).** Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 728-733.
- Julkunen-Tiitto R. (1985).** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 213-217.
- Karagözler A. A., Erdağ B., Emek Y. Ç. and Uygun D. A. (2008).** Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111: 400-407.
- Kato M., Ochiai R. Kozuma K., Sato H. and Katsuragi Y. (2018).** Effect of Chlorogenic Acid Intake on Cognitive Function in the Elderly: A Pilot Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018: 1-8.
- Khan H. (2014).** Medicinal Plants in Light of History: Recognized Therapeutic Modality. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 19: 216-219.

Références bibliographiques

- Kiattisin K., Nantarat T. and Leelapornpisid P. (2016).** Evaluation of antioxidant and anti-tyrosinase activities as well as stability of green and roasted coffee bean extracts from *Coffea arabica* and *Coffea canephora* grown in Thailand. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 8:182-192.
- Kim D., Chun O., Kim Y., Moon H. and Lee C. (2003).** Quantification of phenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6509-6515.
- Kwon S. H., Lee H. K., Kim J. A., Hong S. I., Kim H. C., Jo T. H., Park Y. I., Lee C. K., Kim Y. B. and Lee S. Y. (2010).** Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology*, 649: 210-217.
- Labouisse J. P. and Adolphe C. (2012).** Conserver et gérer les ressources génétiques du caféier Arabica (*Coffea Arabica* L.) : un défi pour l'Éthiopie. *Cahiers Agricultures*, 21: 98-105.
- Lamorde M., Tabuti J. R. S., Obua C., Byobona C. K., Lanyero H., Kibwika P. B., Bbosa G. S., Lubega A., Ogwal-Okeng J., Ryan M., Waako P. J. and Merry C. (2010).** Medicinal plants used by traditional medicine practitioners for the treatment of HIV/AIDS and related conditions in Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*, 130: 43-53.
- Lapchak P. A. (2007).** The phenylpropanoid micronutrient chlorogenic acid improves clinical rating scores in rabbits following multiple infarct ischemic strokes: synergism with tissue plasminogen activator. *Experimental Neurology*, 205: 407-413.
- Lee C. (2000).** Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta*, 295: 141-154.
- Lee K. J., Choi J. H. and Jeong H. G. (2007).** Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpènes kahweol and Cafestol on carbon tetrachloride induced liver damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 2118-2125.
- Martínez-Pinilla E., Oñatibia-Astibia A. and Franco R. (2015).** The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Frontiers in Pharmacology*, 6: 1-5.
- Marx B., Scuvée É., Scuvée-Moreau J., Seutin V. and Jouret F. (2016).** Mécanismes de l'effet diurétique de la caféine. *Médecine sciences*, 32: 485-490.

Références bibliographiques

- Mau J. L., Huang P. N., Huang S. J. and Chen C. C. (2004).** Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia. *Food Chemistry*, 86: 25-31.
- MEL Sayed N., SALharthi M., MALLEhyani N. and NALotaibi A. (2018).** Determination of antibacterial activity of Green Coffee Arabica bean extract on Multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). *IOSR Journal of Pharmacy*, 8: 33-38.
- Mohd Zain M. Z., Bakr Shori A. and Salihin Baba A. (2017).** Composition and Health Properties of Coffee Bean. *European Journal of Clinical and Biomedical Sciences*, 3: 97-100.
- Monteiro J. P., Alves M. G., Oliveira P. F. and Silva B. M. (2016).** Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Molecules*, 21:974.
- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G. N., Traoré D. and Aké-assi L. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes. *Sciences et Nature*, 6: 1-15.
- Nayeem N., Denny G. and Mehta S. K. (2011).** Comparative phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant activity of the methanolic extracts of the leaves of *Coffea arabica* and *Coffea Robusta*. *Der Pharmacia Lettre*, 3: 292-297.
- Novaes F. J. M. (2018).** Coffee Diterpenes: before Harvesting the Bean to your Cup. *Nutrition and Food Science International Journal*, 7: 1-3.
- Onakpoya I., Terry R. and Ernst E. (2010).** The use of green coffee extract as a weight loss supplement: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *Gastroenterology Research and Practice*, 2011: 1-6.
- Pacetti D., Boselli E., Balzano M. and Frega N. G. (2012).** Authentication of Italian Espresso coffee blends through the GC peak ratio between kahweol and 16-O-methylcafestol. *Food Chemistry*, 135:1569-1574.
- Pan S. Y., Litscher G., Gao S. H., Zhou S. F., Yu Z. L., Chen H. Q., Zhang S. F., Tang M. K., Sun J. N. and Ko K. M. (2014).** Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014: 1- 20.
- Patay E. B., Bencsik T., and Papp N. (2016a).** Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9 :1127-1135.

Références bibliographiques

- Patay E. B., Németh T., Németh T. S., Filep R., Vlase L. and Papp N. (2016b).** Histological and phytochemical studies of *Coffea benghalensis* B. Heyne ex Schult, compared study with *Coffea arabica* L. *Farmacia*, 64: 125-130.
- Patay E. B., Sali N., Koszegi T., Csepregi R., Balázs V. L., Németh T. S., Németh T. and Papp N. (2016c).** Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9: 366-371.
- Patui S., Clincon L., Peresson C., Zancani M., Conte L., Terra D. L., Navarini L., Vianello A. and Braidot E. (2014).** Lipase activity and antioxidant capacity in coffee (*Coffea arabica* L.) seeds during germination. *Plant Sciences*, 219:19-25.
- Perdani C. G., Pranowo D. and Qonitatilah. (2019).** Total phenols content of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) in East Java. International Conference on Green Agro-industry and Bioeconomy. *Earth and Environmental Science* 230.
- Perrois C., Strickler S. R., Mathieu G., Lepelley M., Bedon L., Michaux S. and Privat I. (2015).** Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). *Planta*, 241: 179-191.
- Rakatama A. S., Pramono A. and Yulianti R. (2018).** The Antifungal Inhibitory Concentration Effectiveness Test from Ethanol Seed Arabica Coffee (*Coffea arabica*) Extract Against the Growth of *Candida albicans* Patient Isolate With In Vitro Method. *Conference series: Journal of Physics*, 970.
- Ribeiro D. E., Borem F. M., Cirillo M. A., Prado M. V. B., Ferraz V. P., Alves H. M. R. and Taveira J. H. S. (2016).** Interaction of genotype, environment and processing in the chemical composition expression and sensorial quality of Arabica coffee. *African Journal of Agricultural Research*, 11: 2412 -2422.
- Ross I. A. (2005).** *Coffea arabica* L. In: Medicinal plants of the world, New Jersey, *Humana Press Inc*, 3: 155-195.
- Sahoo N., Manchikanti P. and Dey S. (2010).** Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*, 81: 462-71.
- Samarth R. M., Panwar M., Kumar M., Soni A., Kumar M. and Kumar A. (2008).** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food chemistry*, 106: 868-873.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J. A. and Saura-Calixto F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 270-276.

Références bibliographiques

- Sentkowska A., Jeszka-Skowron M. and Pyrzynska K. (2016).** Comparative studies on the antioxidant properties of different Green coffee extracts. *Moj Food Processing & Technology*, 3: 296-302.
- Souza R. M. N. and Benassi M. T. (2012).** Discrimination of Commercial Roasted and Ground Coffees According to Chemical Composition. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23:1347-1354.
- Sun B., Richardo-da-Silvia J. M. and Spranger I. (1998).** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4267.
- Suzuki A., Fujii A., Yamamoto N., Yamamoto M., Ohminami H., Kameyama A., Shibuya Y., Nishizawa Y., Tokimitsu I. and Saito I. (2006).** Improvement of hypertension and vascular dysfunction by hydroxy hydroquinone-free coffee in a genetic model of hypertension. *FEBS Letters*, 580: 2317-2322.
- Suzuki A., Kagawa D., Ochiai R. Tokimitsu I. and Saito I. (2002).** Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 25: 99-107.
- Tabuti J. R. S., Lye K. A. and Dhillon S. S. (2003).** Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *Journal of Ethnopharmacology*, 88:19-44.
- Taguri T., Tanaka T. and Kouno I. (2006).** Antibacterial Spectrum of Plant Polyphenols and Extracts Depending upon Hydroxyphenyl Structure. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29: 2226-2235.
- Tajik N. Tajik M. Mack I. and Enck P. (2017).** The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition*, 56: 2215-2244.
- Thom E. (2007).** The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *Journal of International Medical Research*, 35: 900-908.
- Thorn J. (2002).** Le café, le guide du connaisseur. Modus Vivendi, *Canada*, 16: 254-265.
- Tohda C., Kuboyama T. and Komatsu K. (2005).** Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. *Neurosignals*, 14: 34-45.
- Tsuchiya T., Suzuki O. and Igarashi K. (1996).** Protective effects of chlorogenic acid on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60:765-768.

Références bibliographiques

- Vermerris W. and Nicholson R. (2006).** Phenolic compound Biochemistry. *Springer, Dordrecht, The Netherland*, 211-234.
- Vignoli J. A., Bassoli D. G. and Benassi M. T. (2011).** Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124: 863-868.
- Wijaya W., Ridwan R. D. and Budi H. S. (2016).** Antibacterial ability of arabica (*Coffea arabica*) and robusta (*Coffea canephora*) coffee extract on *Lactobacillus acidophilus*. *Dental Journal*, 49: 99-103.
- Yinyang J., Mpondo Mpondo E., Tchatat M., Ndjib R. C., Mvogo Ottou P. B. and Dibong S. D. (2014).** Les plantes à alcaloïdes utilisées par les populations de la ville de Douala (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 78: 6600 – 6619.
- Yuan H., Ma Q., Ye L. and Piao G. (2016).** The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, 21: 559.
- Złotek U., Karaś M., Gawlik-Dziki U., Szymanowska U., Baraniak B. and Jakubczyk A. (2016).** Antioxidant activity of the aqueous and methanolic extracts of coffee beans (*Coffea arabica* L.). *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*, 15: 281-288.

Annexe

Annexe

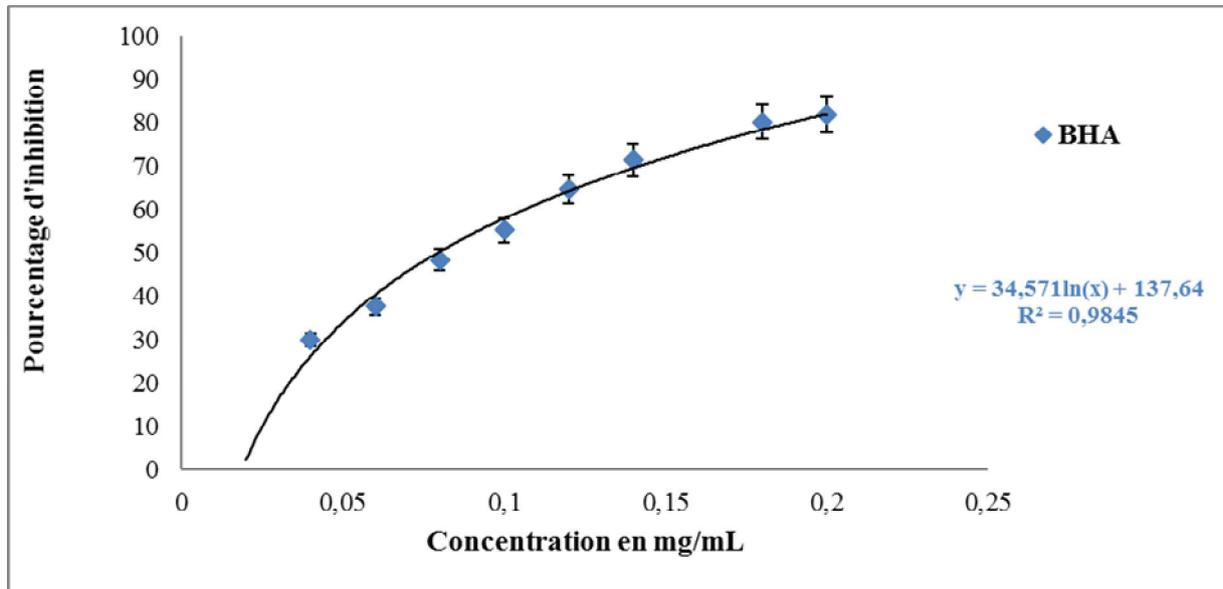


Figure : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du BHA

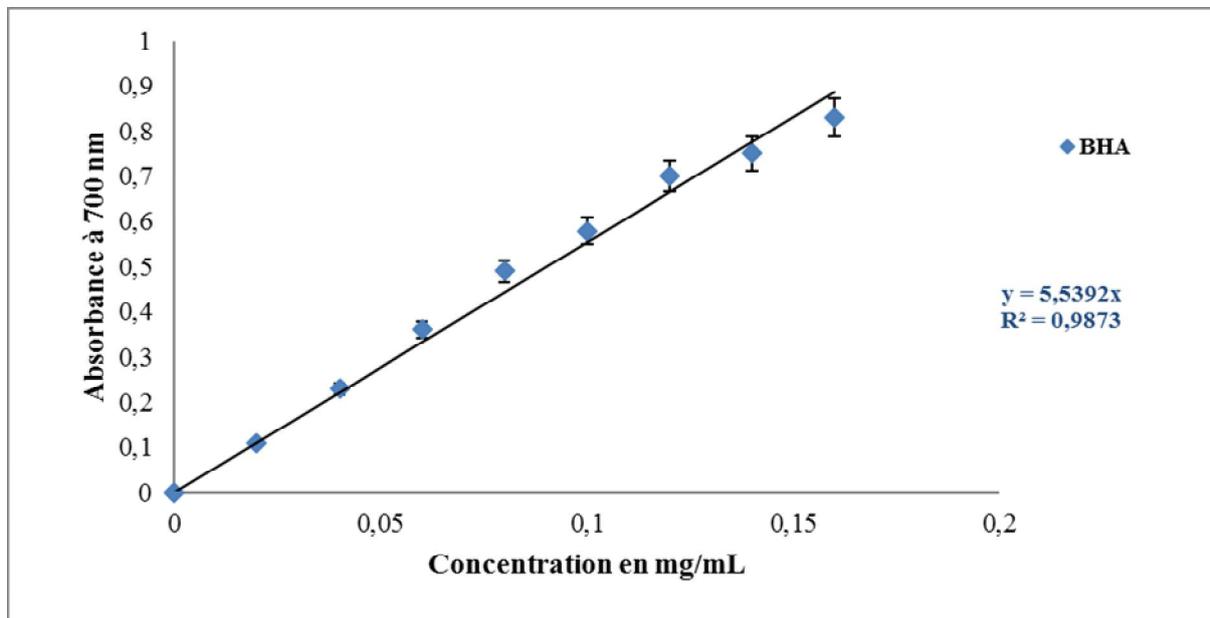


Figure : Pouvoir réducteur du fer du BHA